



Adaptation de *Staphylococcus xylosus* à la matrice carnée, impact des composés nitrosés et utilisation des sources de fer

Aurore Vermassen

► To cite this version:

Aurore Vermassen. Adaptation de *Staphylococcus xylosus* à la matrice carnée, impact des composés nitrosés et utilisation des sources de fer. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22535 . tel-01153499

HAL Id: tel-01153499

<https://theses.hal.science/tel-01153499>

Submitted on 19 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'Auvergne

N° D.U. 2535

ANNEE 2014

ECOLE DOCTORALE

DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

N° d'ordre 656

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Nutrition et Science des Aliments

Soutenue le 18 décembre 2014

Aurore Vermassen

Adaptation de *Staphylococcus xylosus* à la matrice carnée, impact des composés nitrosés et utilisation des sources de fer

Membres du jury :

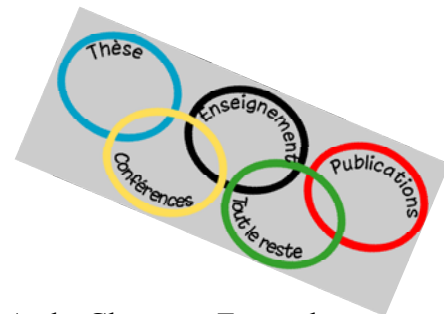
Président M F. Delbac – Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II

Rapporteurs Mme M. Coccagn-Bousquet, Directrice de Recherche, INSA/CNRS - UMR INSA/INRA, Toulouse
Mme M. Coton, Maître de conférences, LUBM EA3882, Brest
M Y. Le Loir, Directrice de Recherche, INRA, Rennes

Membres Mme V. Zuliani, Business Development Manager, CHR HANSEN, Arpajon
Mme R. Talon, Directrice de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand Theix
Mme S. Leroy, Ingénieur de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand Theix

Unité de Recherche 454 Microbiologie
Institut National de la recherche Agronomique - Clermont-Ferrand/Theix

Remerciements



Mon travail de thèse au sein de l'UR 454 Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand Theix se termine. Trois années riches et fructueuses, au cours desquelles il a fallu faire preuve d'adresse à la manière d'une acrobate confirmée entre la thèse, les conférences, l'enseignement, les publications et bien d'autres choses. Merci à toutes les personnes qui m'ont accompagnée pour mener à bien cette expérience.

Je souhaite donc remercier tout particulièrement Régine Talon et Sabine Leroy, mes deux directrices de thèse, pour leur soutien sans faille, leur enthousiasme et leur gentillesse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé faire mes propres choix après de longues discussions scientifiques (et moins scientifiques !). Merci de m'avoir guidée ces 4 dernières années.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Murielle Cocaïgn-Bousquet, Monika Coton et Yves Le Loir qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail ainsi qu'à Frédéric Delbac et Véronique Zuliani qui a accepté de participer à ce jury de thèse.

Merci également aux membres de mon comité de thèse : Souad Christieans, Damien Balestrino, Anne Marie Delort Marie et Christine Champomier-Vergès pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail ainsi que pour leurs conseils et leurs remarques constructives.

Merci à Anne De la Foye de la Plateforme d'exploration du métabolisme, pour son aide précieuse concernant toutes les analyses statistiques réalisées dans ma thèse.

Merci à Virginie Vinatier de l'institut de Chimie, pour ses conseils concernant la mise en place des tests sidérophores.

Merci à tous les membres de l'équipe Badial et notamment :

Jean Paul Chacornac pour son soutien technique tout au long de cette thèse, pour sa bonne humeur et les innombrables balades du midi.

Carine Andant et Yvette Villatte pour leur aide indispensable au quotidien. Carine, merci pour ton aide dans les expériences de la dernière heure.

Brigitte Gaillard Martinie pour son aide dans l'approche en microscopie.

Isabelle Lebert, ex membre de l'équipe, pour son aide sur des calculs improbables.

Merci à mes collaborateurs de passage, CDD ou stagiaires : Pierre Micheau, pour son aide et ses conseils en informatique, Alice Carpentier et Dorian Garraud, pour leur aide technique au cours de cette thèse.

J'ai bien sur une pensée toute particulière pour tous les thésard(e)s (et ami(e)s) qui ont partagé avec moi, des moments de doutes et de joies ces trois dernières années :

Caro, ma confidente. Merci pour ton soutien sans relâche du premier au dernier jour de ma thèse (et plus encore si je compte ma période de M2).

Sandra, mon modèle. Merci de m'avoir montré la « bonne voie de la thésarde »

Geoffrey, la relève. Merci d'avoir été présent dans les derniers moments (les plus difficiles !)

Une pensée chaleureuse et amicale aux stagiaires et thésards que j'ai croisé au cours de ces 4 ans: Marie, Priscilla, Allison, Susana ...

Ces remerciements ne seraient pas complets sans citer Antoine (et Avril), merci d'avoir toujours été là pour m'écouter, m'encourager, me réconforter. Merci pour la patience dont tu as fait preuve pendant cette thèse.

Je dédie enfin cette thèse à mes fans de la première heure : mes parents, mon frère et Balou sans qui je ne serais pas là aujourd'hui et qui m'ont soutenue tout au long de mes études avec un amour et une confiance sans faille, un immense MERCI.

J'exprime enfin toute ma gratitude au Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et des Technologies pour m'avoir attribué une bourse de thèse et pour m'avoir donné la possibilité d'enseigner pendant ma thèse à l'Université d'Auvergne puis à l'Université Blaise Pascal, en tant que monitrice. Merci à Catherine Texier, Hicham El Alaoui et Jean François Jarrige d'avoir guidé mes premiers pas d'enseignante.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	7
INTRODUCTION	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
-CHAPITRE 1-.....	17
<i>Staphylococcus xylosus</i> : taxonomie, bases phénotypiques et habitat	17
1. TAXONOMIE	17
2. PRINCIPAUX CARACTERES PHENOTYPIQUES.....	19
3. UBIQUITE DE <i>S. XYLOSUS</i>	21
3.1. La peau des animaux	21
3.2. Les produits alimentaires.....	21
3.2.1 Les produits carnés fermentés	21
3.2.2 Les produits laitiers fermentés.....	22
3.2.3 Les produits de la mer	22
-CHAPITRE 2-.....	24
Propriétés fonctionnelles de <i>Staphylococcus xylosus</i> en lien avec les substrats des produits carnés fermentés	24
1. LE METABOLISME DES GLUCIDES	25
1.1 La glycolyse	25
1.2 Le système phosphotransférase (PTS).....	26
1.3 Le glucose.....	27
1.4 Le saccharose et le lactose.....	28
1.5 La répression catabolique du carbone	29
2. LE METABOLISME DES LIPIDES ET DES ACIDES GRAS	30
2.1 La lipolyse	31
2.2 L'oxydation des acides gras	32
2.3 Superoxyde dismutase	33
2.4 Catalase	34
3. LE METABOLISME DES PROTEINES ET ACIDES AMINES.....	35
3.1 La protéolyse	35
3.2 Le catabolisme des acides aminés	36
-CHAPITRE 3-.....	38

Catabolisme des composés nitrosés chez les staphylocoques	38
1. ROLE DES NITRATES ET DES NITRITES DANS LES PRODUITS CARNES	39
2. LE CATABOLISME DES COMPOSES NITROSES PAR LES STAPHYLOCOQUES	40
2.1 La nitrate réductase	41
2.1.1 L'activité nitrate réductase	41
2.1.2 L'opéron <i>nar</i>	42
2.2 La nitrite réductase	45
2.2.1 L'activité nitrite réductase	45
2.3 Mécanismes de régulation des opérons <i>nar</i> et <i>nir</i>	47
3. PRODUITS CARNES FERMENTES SANS AJOUT DE NITRATE ET DE NITRITE.....	49
-CHAPITRE 4-.....	52
Acquisition, régulation et homéostasie du fer chez les staphylocoques.....	52
1. ACQUISITION DU FER	52
1.1 Généralités.....	52
1.2 L'acquisition directe.....	53
1.2.1 Le système Isd	53
1.2.2 Le système Fep	55
1.2.3 Le système opp	56
1.2.4 Le système Sit/Mnt.....	57
1.3 L'acquisition indirecte.....	58
1.3.1 La staphyloferrine A.....	58
1.3.2 La staphyloferrine B.....	59
1.3.3 Le transport de sidérophores exogènes.....	60
2. REGULATION ET HOMEOSTASIE DU FER	62
2.1 Régulation	62
2.1.1 Le régulateur Fur	62
2.1.2 Le régulateur SirR	63
2.2 Séquestration du fer.....	65
3. LE FER DANS L'ENVIRONNEMENT CARNE	66
3.1 Généralités.....	66
3.2 Les protéines hémiques : l'hémoglobine et la myoglobine	67
3.3 Les protéines non hémiques : la transferrine et la ferritine	68
RESULTATS	71
ANALYSE <i>IN SILICO</i>	73
Les clusters liés à l'acquisition et la régulation des nitrites et nitrates: <i>nir</i> , <i>nar</i> et <i>nre</i>	75

Les clusters liés à l'acquisition et la régulation du fer	76
COMPORTEMENT GLOBAL DE LA SOUCHE <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> C2A DANS LA MATRICE VIANDE.....	79
Contexte de l'étude.....	81
Résultats préliminaires	81
Extraction des ARN.....	81
Création de la plateforme NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)	83
Soumission de l'ensemble des données brutes obtenues sur NCBI Gene Expression Omnibus	83
Résultats principaux de l'étude	84
Article 1	87
COMPORTEMENT GLOBAL DE LA SOUCHE <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> C2A DANS LA VIANDE EN PRESENCE DE NITRATE ET DE NITRITE	109
Contexte de l'étude.....	111
Résultats principaux de l'étude	111
Article 2.....	115
UTILISATION DE DIFFERENTES SOURCES DE FER CHEZ LA SOUCHE <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> C2A : ETUDE DU MECANISME D'ACQUISITION DU FER A PARTIR DE LA FERRITINE	143
Contexte de l'étude.....	145
Résultats préliminaires	145
Croissance en présence de différentes sources de fer.....	145
Mise en évidence de la production de sidérophore en milieu carencé en fer	147
Résultats principaux de l'étude	148
Résultats complémentaires de l'étude	149
Dosage du fer intracellulaire et extracellulaire.....	149
Visualisation de la ferritine en surface de <i>S. xylosus</i>	150
Article 3.....	153
DISCUSSION	171
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
TRAVAUX SCIENTIFIQUES	219
Communications orales	222
Communications affichées	226
ANNEXES	233

Liste des figures

Figure 1: Fabrication industrielle du saucisson de type français.....	24
Figure 2: Le métabolisme du glucose.....	26
Figure 3: Le système PTS	27
Figure 4: La répression catabolique du glucose par la protéine CcpA chez les staphylocoques.....	30
Figure 5: Métabolisme des lipides.....	32
Figure 6: Métabolisme des protéines et acides aminés	35
Figure 7: Voie proposée par Beck <i>et al</i> (2004) pour la dégradation du glucose et de la leucine chez <i>S. xylosus</i>	36
Figure 8: Réactions simplifiées des nitrates et des nitrites dans un produit carné fermenté	39
Figure 9: Représentation schématisée de la réduction du nitrate et du nitrite chez <i>S. carnosus</i>	41
Figure 10: L'opéron <i>nar</i> chez <i>Staphylococcus carnosus</i>	43
Figure 11: Modèle de la réduction du nitrate par la nitrate réductase	44
Figure 12: L'opéron <i>nir</i> chez <i>Staphylococcus carnosus</i>	45
Figure 13: Modèle de l'expression et de la régulation de l'opéron <i>nir</i>	47
Figure 14: Carte génétique des gènes impliqués dans la réduction et la régulation des nitrate/nitrite chez (A) <i>S. carnosus</i> et (B) <i>S. aureus</i>	48
Figure 15: Modèle de la fonction de NreA dans la régulation de l'expression de <i>narG</i> chez <i>S. aureus</i> en condition anaérobie (A) en absence et (B) en présence de nitrate	49
Figure 16: Acquisition du fer de l'hème chez <i>S. aureus</i>	55
Figure 17: Le système Fep	56
Figure 18: Le système Opp1	57
Figure 19: Le système Sit.....	57
Figure 20: La staphyloferrine A chez <i>S. aureus</i>	59
Figure 21: La staphyloferrine B chez <i>S. aureus</i>	60
Figure 22: Le système Fhu chez <i>S. aureus</i>	61
Figure 23: Le système Sst chez <i>S. aureus</i>	62
Figure 24: Le système Hrt/Hss chez <i>S. aureus</i>	65
Figure 25: Structure protéique de l'hème, de l'hémoglobine et de la myoglobine	68
Figure 26: Structure protéique de la transferrine et de la ferritine	69
Figure 27: Les clusters <i>nir</i> , <i>nar</i> et <i>nre</i> chez <i>S. xylosus</i> C2a.....	75
Figure 28: Le cluster <i>sit</i> et le gène <i>sirR</i> chez <i>S. xylosus</i> C2a	76
Figure 29: Les clusters (A) <i>sfa</i> et <i>hts</i> , (B) <i>fhu</i> et (C) <i>sst</i> chez <i>S. xylosus</i> C2a.....	77
Figure 30: Les clusters <i>hss/hrt</i> chez <i>S. xylosus</i> C2a	77
Figure 31: Electrophorèse des ARN totaux extraits à différents temps d'incubation après analyse par la puce Agilent RNA 6000 nano	83
Figure 32: Croissance de <i>S. xylosus</i> en présence (A) de ferritine, (B) de transferrine, (C) de myoglobine, (D) d'hémoglobine et (E) de FeSO ₄	146
Figure 33: Test CAS sur le surnageant de culture de <i>S. xylosus</i> C2a en Mx0 (A) surnageant de culture, (B) témoin positif : pyoverdine et (C) témoin négatif : Mx0 non ensemencé.....	147
Figure 34: Test O-CAS en milieu Mx0 agar avec (A) <i>S. aureus</i> MW2 et (B) <i>S. xylosus</i> C2a.....	148
Figure 35: Visualisation de la ferritine dans l'environnement cellulaire de <i>S. xylosus</i> par microscopie électronique à transmission (A) et (B) marquage immunologique, (C) après inclusion directe dans la résine	151

Figure 36: Gènes liés au métabolisme des glucides et différentiellement exprimés chez <i>S. xylosus</i> lors de sa survie dans le modèle viande	174
Figure 37: Gènes liés au métabolisme des acides aminés et différentiellement exprimés chez <i>S. xylosus</i> lors de sa survie dans le modèle viande.....	176
Figure 38: Gènes liés à l'osmoprotection et différentiellement exprimés chez <i>S. xylosus</i> lors de sa survie dans le modèle viande.....	179
Figure 39: Résumé des voies principales et leur regulation affectées par le stress nitrosant chez <i>S. xylosus</i> en modèle viande	183
Figure 40: Représentation schématique du modèle de l'utilisation du fer de la ferritine chez <i>S. xylosus</i>	189

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des espèces et sous espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	18
Tableau 2: Principaux caractères phénotypiques de <i>Staphylococcus xylosus</i>	20
Tableau 3: Teneurs en fer total et pourcentage en fer hémique/non hémique dans la viande de bœuf et de porc.	67
Tableau 4: Bilan des extractions des ARN à partir de matrice viande	82
Tableau 5: Vitesse maximale de croissance de <i>S. xylosus</i> en présence de ferritine, FeSO ₄ , transferrine, myoglobine ou hémoglobine	147
Tableau 6: Bilan des dosages de fer	150

INTRODUCTION

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) représentent un groupe de plus de trente espèces. Ils sont commensaux de la peau et des muqueuses des animaux et se retrouvent donc naturellement présents dans de nombreux aliments d'origine animale.

Au sein des SCN, l'espèce *Staphylococcus xylosus* tient une place particulière car elle est fréquemment isolée de produits carnés, laitiers et d'environnements agroalimentaires. *S. xylosus* est couramment utilisé comme ferment pour son rôle majeur dans le développement de la flaveur et de la couleur des produits fermentés. Via son activité lipolytique et sa capacité à cataboliser les acides aminés, notamment ceux à chaîne ramifiée (leucine, valine, isoleucine), *S. xylosus* influence la composition en composés aromatiques volatils et non-volatils. D'autre part, ses propriétés anti-oxydantes permettent de limiter le rancissement.

Dans les produits carnés fermentés, il est d'usage d'ajouter du nitrate mais également du nitrite comme additifs principalement pour leurs effets sur la couleur. Le nitrate est réduit en nitrite par les bactéries telles que *S. xylosus* qui a une activité nitrate réductase. Le nitrite est transformé en monoxyde d'azote (NO) qui va influencer la couleur des produits carnés en réagissant avec le principal pigment de la viande : la myoglobine. Si les activités nitrate et nitrite réductases chez *Staphylococcus carnosus*, autre ferment utilisé en salaison, sont bien caractérisées *in vitro*, celles de *S. xylosus* ne le sont pas et de plus l'expression de ces gènes *in situ* est méconnue. En fait l'expression globale des gènes de ces ferments en réponse à ces composés est totalement méconnue *in situ*.

La viande est un aliment riche en différentes sources de fer. Le fer est majoritairement complexé à des protéines hémiques (hémoglobine, myoglobine) mais peut aussi se complexer à d'autres protéines comme la transferrine ou la ferritine ou à des composés organiques (citrate, ascorbate, ATP...). Afin de pouvoir coloniser l'environnement dans lequel elles se trouvent, la plupart des bactéries ont mis en place différents mécanismes visant à acquérir du fer de façon directe ou indirecte. Les systèmes d'acquisition et de transport du fer ainsi que leur régulation sont bien décrits chez *Staphylococcus aureus*, une bactérie pathogène qui appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive. En revanche peu d'études se sont intéressées à ce sujet chez les SCN et aucun système n'a encore été décrit chez le ferment *S. xylosus*.

L'objectif de ce travail de thèse était de caractériser la physiologie de *Staphylococcus xylosus* *in situ* en matrice carnée, puis de déterminer l'impact des composés nitrosés et enfin d'étudier la croissance de *S. xylosus* en fonction de différentes sources de fer. Plus

particulièrement, je me suis attachée à comprendre le mécanisme d'acquisition du fer provenant de la ferritine chez *S. xylosus*.

Le premier volet de ce mémoire est une **étude bibliographique** qui fait une brève présentation de *S. xylosus*, puis une synthèse des connaissances concernant les propriétés fonctionnelles de *S. xylosus* en tant que ferment carné : par sa capacité à dégrader les composants de la viande (les glucides, les lipides et les protéines) et par sa capacité à cataboliser le nitrate. Une autre partie concernant l'acquisition, la régulation et l'homéostasie du fer chez les staphylocoques a été également développée.

Après avoir décrit les gènes majeurs impliqués dans l'acquisition et la régulation des nitrates/nitrites et du fer chez *S. xylosus* (**Analyse *in silico***), le deuxième volet présente les résultats sous forme de trois publications. La première porte sur l'adaptation de *S. xylosus* en milieu carné (**Article 1**). La deuxième porte sur la réponse adaptative de *S. xylosus* en réponse aux composés nitrosés dans la viande (**Article 2**). Pour ces deux études une approche globale de transcriptomique a été choisie. La troisième publication porte sur le mécanisme original mis en place par *S. xylosus* pour acquérir du fer contenu dans la ferritine (**Article 3**). Pour cette étude des approches de PCR quantitatives ciblées et de mutagenèse ont été réalisées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

-CHAPITRE 1-

***Staphylococcus xylosus* : taxonomie, bases phénotypiques et habitat**

1. TAXONOMIE

Le nom *Staphylococcus* (staphyle, grappe de raisin) a été introduit par Ogston (1883) pour définir le groupe des micrococci responsable de la survenue d'inflammation et suppuration. Une description plus formelle du genre *Staphylococcus* a par la suite été réalisée par Rosenbach (1884). Jusqu'à la fin des années 1990, ce genre était classé au sein du groupe des *Micrococcaceae* avec notamment les genres *Micrococcus* et *Stomatococcus*. Les membres du genre *Staphylococcus* diffèrent de ceux du genre *Micrococcus* par leur métabolisme anaérobie facultatif, par un contenu en G+C compris entre 30 et 39% (contre 63 à 73% pour *Micrococcus*) et par la présence de peptides oligoglycines dans les ponts peptidiques de la paroi (Pellerin *et al.*; 2010). Le genre *Staphylococcus* appartient désormais au phylum XIII des *Firmicutes*, à la classe III des *Bacilli*, à l'ordre I des *Bacillales* et à la famille des *Staphylococcaceae* (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, <http://www.bacterio.net/>). Le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 48 espèces et 24 sous-espèces (Tableau 1). La présence d'une coagulase, enzyme coagulant le plasma sanguin, permet la distinction de 2 groupes : les staphylocoques à coagulase positive (SCP) qui comprennent 7 espèces dont *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), groupe plus vaste qui comprend une quarantaine d'espèces.

Les *Staphylococcus* sont des cocci à Gram positif, qui se présentent, en observation microscopique, isolés, en diplocoques, en courtes chaînettes ou en amas. Ces coques sont non mobiles, asporulés et habituellement non capsulés. La plupart des espèces sont à catalase positive et aéro-anaérobies facultatives à l'exception de *Staphylococcus saccharolyticus* et *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* qui sont anaérobies strictes.

Tableau 1: Liste des espèces et sous espèces du genre *Staphylococcus*
(D'après <http://www.bacterio.net/>)

Espèces et sous espèces	Coagulase	Groupes d'espèces
<i>S. arlettae</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. agnetis</i>	-	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> <i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	+	<i>S. aureus</i>
<i>S. auricularis</i>	-	<i>S. auricularis</i>
<i>S. capitis</i> <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> <i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. caprae</i>	-	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. carnosus</i> <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	-	<i>S. simulans</i>
<i>S. chromogenes</i>	-	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. cohnii</i> <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. condimentii</i>	-	<i>S. simulans</i>
<i>S. delphini</i>	+	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. devriesei</i>	-	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. equorum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. felis</i>	-	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. fleurettii</i>	-	<i>S. sciuri</i>
<i>S. gallinarum</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. hominis</i> <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	-	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. hyicus</i> <i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i> <i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	+	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. intermedius</i>	+	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. jettensis</i>	-	<i>S. haemolyticus</i>
<i>S. kloosii</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. lentus</i>	-	<i>S. sciuri</i>
<i>S. lugdunensis</i>	-	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. lutrae</i>	+	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. massiliensis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. microti</i>	-	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. muscae</i>	-	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. nepalensis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. pasteurii</i>	-	<i>S. warneri</i>
<i>S. pettenkoferi</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. piscifermentans</i>	-	<i>S. simulans</i>
<i>S. pseudintermedius</i>	+	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. pulvereri</i>	-	<i>S. sciuri</i>
<i>S. rostri</i>	-	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. saccharolyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>
<i>S. saprophyticus</i> <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. schleiferi</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	+	<i>S. hyicus-intermedius</i>
<i>S. sciuri</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	-	<i>S. sciuri</i>
<i>S. simiae</i>	-	<i>S. aureus</i>
<i>S. simulans</i>	-	<i>S. simulans</i>
<i>S. stepanovicii</i>	-	<i>S. sciuri</i>
<i>S. succinus</i> <i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i> <i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>
<i>S. vitulinus</i>	-	<i>S. sciuri</i>
<i>S. warneri</i>	-	<i>S. warneri</i>
<i>S. xylosus</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>

2. PRINCIPAUX CARACTERES PHENOTYPIQUES

S. xylosus a été isolé pour la première fois de la peau humaine par Schleifer et Kloos (1975). Les auteurs avaient réalisé une série de prélèvements sur la peau d'une quarantaine d'individus et après analyse des isolats par différents tests morphologiques, physiologiques, chimiques et biochimiques, ils ont identifié 7 nouvelles espèces de staphylocoques. La description de l'espèce *S. xylosus* a été basée sur un total de 102 souches isolées présentant les mêmes caractéristiques dont les principales sont présentées dans le Tableau 2.

S. xylosus est phénotypiquement distinct des autres staphylocoques par son profil de fermentation des hydrates de carbone. En effet, cette bactérie aérobie-anaérobie facultative, contrairement à la plupart des autres staphylocoques, fermente le xylose et l'arabinose. *S. xylosus* possède également une composition pariétale particulière puisque son peptidoglycane est de type L-Lys-Gly5-6 et son acide teichoïque contient de la glucosamine et deux polyols : le glycérol et le ribitol (Kloos & Schleifer, 1975; Kloos & Schleifer, 1986). Cette composition est proche de celle de la paroi de *Staphylococcus saprophyticus*, ce qui conforte le lien de parenté génétique entre ces deux bactéries (Kloos & Schleifer, 1986). Une autre caractéristique de *S. xylosus* est sa capacité à croître dans une large gamme de températures. Toutes les souches se développent à une température de 15°C jusqu'à des températures inférieures à 45°C. Toutes les souches de *S. xylosus* sont résistantes à la novobiocine comme toutes les espèces appartenant au groupe de *S. saprophyticus* et produisent peu d'acide en condition de culture anaérobie. La majorité des souches de *S. xylosus* est capable de réduire le nitrate et produit une phosphatase alcaline. Enfin la majorité des souches de *S. xylosus* sont pigmentées présentant une couleur orangée, les autres souches présentent, quant à elles, une couleur jaune-beige claire (Kloos & Bannerman, 1999; Kloos & Scheifer, 1986).

Tableau 2: Principaux caractères phénotypiques de *Staphylococcus xylosus*

Adapté de Kloos & Bannerman (1999); Kloos & Scheifer (1986)

Caractéristiques	<i>S. xylosus</i>
Diamètre de la colonie +/- 6 mm	+
Pigmentation de la colonie: caroténoïdes	d
Croissance anaérobie	d
Croissance aérobie	+
Croissance en NaCl 10%	+
Croissance avec (NH ₄) ₂ SO ₄ (seule source d'azote)	+
Coagulase (plasma de lapin)	-
"Clumping factor"	-
Thermonucléase	-
Hémolyse	-
Catalase	+
Oxydase modifiée	-
Phosphatase alcaline	d
Pyrrolidonyl arylamidase	d
Ornithine décarboxylase	-
Uréase	+
β-Glucosidase	+
β-Glucuronidase	+
β-Galactosidase	+
Arginine dihydrolase	-
Production d'acétoïne	d
Réduction du nitrate	d
Hydrolyse de l'esculine	d
Résistance à la novobiocine	+
Production d'acide en aérobie à partir de:	
D-Tréhalose	+
D-Mannitol	+
D-Mannose	+
D-Turanose	d
D-Xylose	+
D-Cellobiose	-
L-Arabinose	d
Maltose	+
Sucrose	+
N-Acétylelucosamine	+
Raffinose	-

Symboles: +, 90% ou plus de souches positives; -, 90% ou plus de souches négatives; d, 11 à 89% de souches positives

3. UBIQUITE DE *S. XYLOSUS*

3.1. La peau des animaux

Comme beaucoup d'autres espèces du genre *Staphylococcus*, *S. xylosus* est une espèce commensale de l'épithélium et des muqueuses des animaux et plus particulièrement des mammifères (Kloos *et al.*, 1976; Nagase *et al.*, 2002). Il est présent chez une large variété d'espèces animales (porcine, bovine, équine, canidée, aviaire), avec un fort pourcentage d'isolats chez les animaux de fermes mais également chez les petits rongeurs et (Kloos *et al.*, 1976; Nagase *et al.*, 2002; Silvanose *et al.*, 2001; Slaughter *et al.*, 2001). Malgré que cette espèce ait été découverte pour la première fois à partir de prélèvements sur la peau humaine, son occurrence est faible (Kloos *et al.*, 1976). En effet, en laboratoire, *S. xylosus* montre des difficultés à croître sur des milieux dont le pH est inférieur à 5,3, or le pH de la peau humaine est de 5 alors que le pH de la peau des animaux est évalué à environ 7. Selon Kloos *et al.* (1976), les souches de *S. xylosus* isolées de la peau humaine correspondraient plus à une contamination par les animaux domestiques qu'à une vraie colonisation. La forte présence de l'espèce *S. xylosus* sur la peau des animaux de ferme pourrait expliquer sa forte prévalence dans les produits carnés et laitiers naturellement fermentés (Coton *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2010).

3.2. Les produits alimentaires

3.2.1 Les produits carnés fermentés

L'écologie de *S. xylosus* dans les produits de salaison nonensemencés etensemencés a été particulièrement étudiée.

Dans les produits carnés frais, *S. xylosus* a été isolé de saucisses fraîches nonensemencées de porc, stockées à 4°C. Cette espèce représentait 48% des isolats (Rantsiou *et al.*, 2005). Dans les produits de salaisons traditionnels, c'est-à dire nonensemencés, *S. xylosus* est très souvent décrit comme l'espèce majoritaire dans les produits finis. Il a été très souvent isolé des saucissons français (Montel *et al.*, 1996), italiens (Cocolin *et al.*, 2001; Coppola *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2001) et grecs (Drosinos *et al.*, 2005; Papamanoli *et al.*, 2003; Samelis *et al.*, 1998). Dans les produits carnés fermentés espagnols, *S. xylosus* peut être l'espèce dominante (Garcia-Varona *et al.*, 2000) alors qu'un mélange de trois espèces *S. xylosus*, *S. carnosus* et *Staphylococcus epidermidis* est retrouvé dans les chorizos à pH acide (Aymerich *et al.*, 2003).

Plus récemment, Leroy et al (2010) ont montré par une approche de macroarray basée sur l'amplification du gène *sod* suivie d'une hybridation avec des oligonucléotides spécifiques d'espèces que les trois espèces prédominantes retrouvées dans les saucissons français étaient *Staphylococcus equorum* (58.2%), suivi par *S. saprophyticus* (11.9%) et *S. xylosus* (11.3%). *S. xylosus* constitue par ailleurs un des principaux ferments ensemencé avec les bactéries lactiques dans les produits carnés fermentés. Dans les ateliers industriels de fabrication de saucissons où *S. xylosus* est utilisé comme ferment, il reste majoritaire quel que soit le stade de fermentation, montrant une bonne adaptation de la bactérie aux différents processus de fabrication (Blaiotta *et al.*, 2004; Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2007).

3.2.2 Les produits laitiers fermentés

Un microbiote d'affinage colonise la surface de différents fromages tels que ceux à pâte molle (Camembert, Munster, Livarot), à pâte persillée ou à pâte cuite. En surface des fromages à pâte molle, les bactéries d'affinage majoritaires sont les bactéries corynéformes et les staphylocoques. *S. equorum*, *Staphylococcus vitulinus* et *S. xylosus* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées sur ces fromages (Irlinger *et al.*, 1997; Irlinger, 2008). Lors de l'affinage du Munster, *S. xylosus* est ajouté comme ferment pour ses propriétés aromatiques et sa pigmentation orangée (Irlinger *et al.*, 1997). Bien que la répartition des espèces soit fonction du type de fromage considéré, il est toutefois admis que les staphylocoques à coagulase négative sont principalement rencontrés en début d'affinage et en petit nombre en comparaison des bactéries corynéformes (Brennan *et al.*, 2002). La biodiversité des staphylocoques à coagulase négative a été étudiée dans des échantillons de fromages français (Coton *et al.* 2010). Cette étude a montré que *S. equorum* (23.4%), *S. xylosus* (20.3%), *Staphylococcus succinus* (10.6%) et *S. saprophyticus* (10.1%) étaient les quatre espèces majoritaires dans les produits laitiers. *S. xylosus* étant la deuxième espèce retrouvée de façon prévalente dans le fromage, la troisième espèce retrouvée dans le lait cru et la première retrouvée dans l'environnement laitier (Coton *et al.*, 2010).

3.2.3 Les produits de la mer

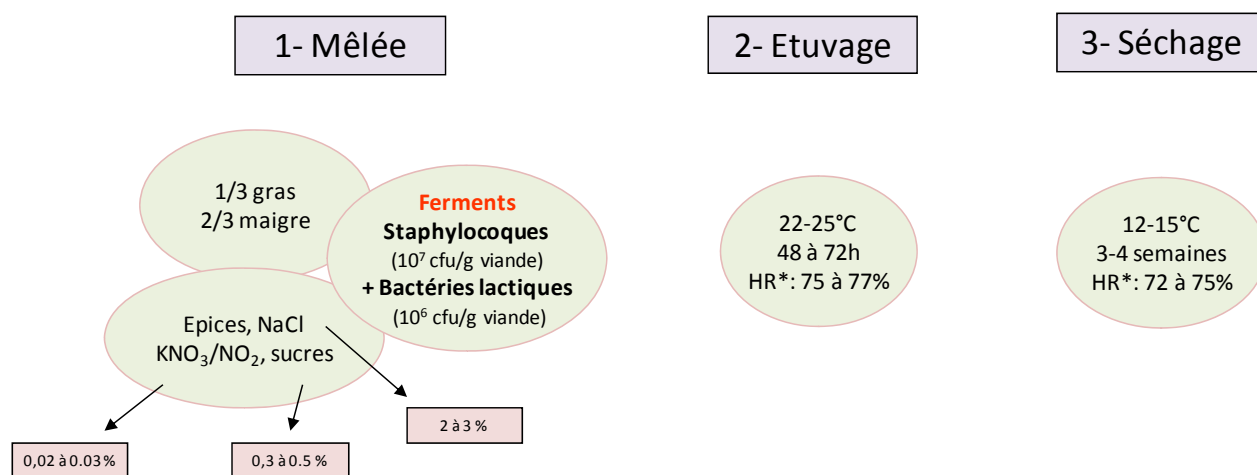
La présence de *S. xylosus* lors du processus de fermentation d'un poisson nommé « cassava » a été décrite (Anihouvi *et al.*, 2007). Cette fermentation aboutit à un condiment le *lanhouin* couramment utilisé dans certains pays d'Afrique. Parmi les staphylocoques isolés, 34,1%

étaient des *S. xylosus*, l'espèce majoritaire étant *Staphylococcus lentus* (51.2%). Ces deux espèces ont été retrouvées à tous les stades de la fermentation du *lanhouin* (Anihouvi *et al.*, 2007). Plusieurs études de biopréservation se sont concentrées sur les bactéries capables de dégrader l'histamine, amine biogène responsable de 30 à 40% des toxi-infections alimentaires liées à la consommation de produits de la pêche, par production d'amine oxydase. Ainsi, une souche de *S. xylosus*ensemencée dans des préparations d'anchois salés et fermentés a été capable de dégrader 38% de l'histamine produite (Mah & Hwang, 2009).

-CHAPITRE 2-

Propriétés fonctionnelles de *Staphylococcus xylosus* en lien avec les substrats des produits carnés fermentés

Le saucisson sec est une préparation obtenue par broyage, mélange, embossage, étuvage et séchage de maigres et de gras de porc auxquels sont éventuellement ajoutés du sel, du sucre, de la poudre de lait, des aromates, des épices, des alcools, des condiments, des arômes, des ferments ou d'autres additifs (L'encyclopédie de la charcuterie, 2004) (Figure 1). Pour une fabrication industrielle, les proportions suivantes sont généralement respectées dans la mûlée : 1/3 de gras de porc et 2/3 de maigre de viande auxquels sont ajoutés des épices, du sel (2 à 3%), un mélange nitrate/nitrite (0,02 à 0,04%) et du sucre (0,3 à 0.5 %). La mûlée estensemencée avec un mélange de ferments (staphylocoques et bactéries lactiques) de manière à obtenir respectivement, 10^7 et 10^6 cfu/g de mûlée pour chaque espèce bactérienne. Ainsi *Lactobacillus sakei* ou *Lactobacillus curvatus* associé à *S. carnosus* ou *S. xylosus* sont fréquemment utilisés. Ces bactéries se multiplient pendant la phase d'étuvage et restent majoritaires tout au long du processus de maturation (Talon *et al.*, 2002).



*HR : Humidité Relative

Figure 1 : Fabrication industrielle du saucisson de type français

Les composants de la m  lee, essentiellement les glucides ajoutés mais aussi les lipides et les protéines, vont servir de substrats pour le développement et la survie des ferments. Les ferments carnés tel que *S. xylosus* ont la capacité de dégrader ces composants et contribuent de ce fait au développement des propriétés sensorielles de la viande.

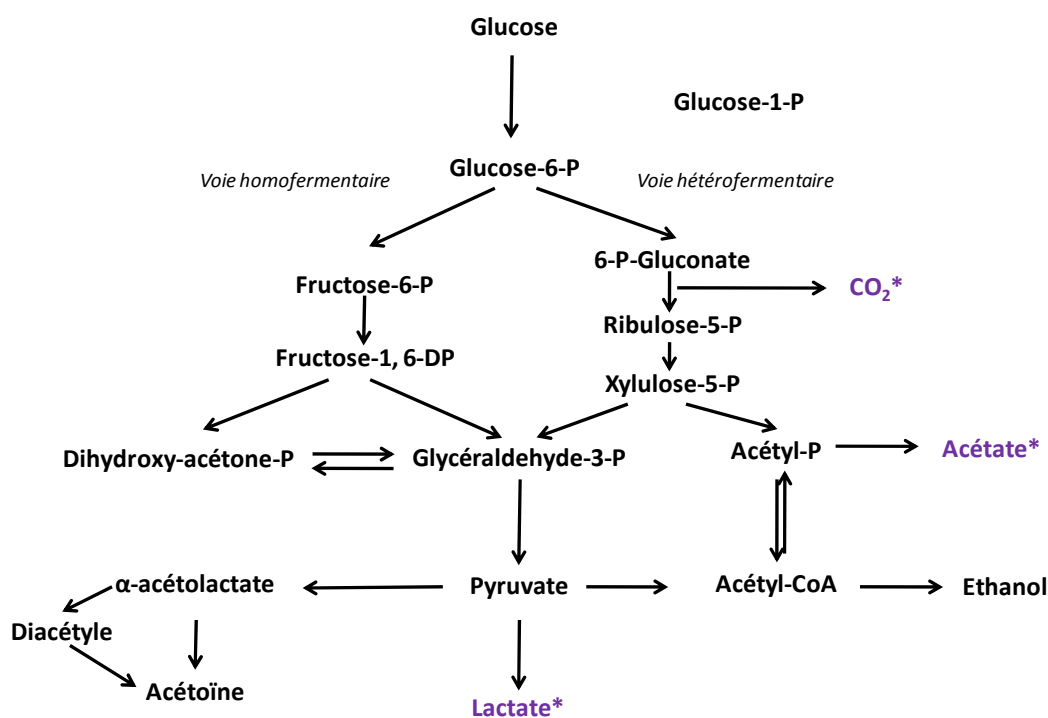
1. LE METABOLISME DES GLUCIDES

Les sucres utilisés en salaison sont essentiellement le glucose, le saccharose et/ou le lactose. Ils permettent d'obtenir une acidification plus ou moins rapide et intense des produits dès la phase d'étuvage. L'acidification dépend de la nature et de la concentration du glucide utilisé (Arkoudelos & Nychas, 1995). L'acidification a un rôle essentiel dans la saveur des saucissons (Leroy *et al.*, 2006). La production d'acides est essentiellement assurée par les bactéries lactiques, les staphylocoques ne contribuant que modérément à cette production (Montel *et al.* 1996). Le métabolisme des glucides est assez bien caractérisé chez *S. xylosus*, notamment pour le glucose, le saccharose et le lactose, leur métabolisme respectif sera développé dans ce chapitre.

1.1 La glycolyse

La voie principale d'utilisation du glucose chez les staphylocoques est la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) et la voie des pentoses phosphates (Brückner & Rosenstein, 2006). Dans des conditions de croissance en milieu complexe, environ 85% du glucose est catabolisé par la voie d'EMP. Le produit final prédominant du métabolisme anaérobie du glucose est le lactate bien que celui-ci soit produit en faible quantité, notamment chez *S. xylosus* (Figure 2) (Brückner & Rosenstein, 2006). La production d'acétoïne (acétyl méthyl carbinol), qui habituellement est associée avec le diacétyle à des arômes de beurre, est très faible, voir absente, chez *S. xylosus* (Kloos & Schleifer 1986). De fortes concentrations d'acétoïne sont par contre retrouvées dans les saucissons inoculés avec *S. saprophyticus* ou *S. warneri* (Montel *et al.* 1996). En condition de croissance aérobie, les produits finaux sont l'acétate et le CO₂ (Figure 2). Le glucose entre dans la voie d'EMP sous forme de glucose-6-phosphate produit suite au transport et à la phosphorylation induite par le système PTS (Brückner &

Rosenstein, 2006). De nombreux autres hydrates de carbone, hexoses, hexitols ou disaccharides tels que le fructose, le mannitol, le saccharose ou le maltose rentrent dans la voie d'EMP grâce à l'activité d'enzymes périphériques spécifiques d'un ou plusieurs sucres telles que des perméases, des hydrolases, des kinases et des déshydrogénases (Brückner & Rosenstein, 2006).



* : Métabolites majoritaires produits chez *S. xylosus*

Figure 2: Le métabolisme du glucose

1.2 Le système phosphotransférase (PTS)

Le système PTS est impliqué dans les premières étapes de l'interconversion catabolique des hydrates de carbone (Brückner & Rosenstein, 2006). Le système PTS est un complexe enzymatique qui permet, en une seule étape, la translocation et la phosphorylation des sucres à travers la membrane. Le système PTS est dépendant du phosphoénolpyruvate (PEP), donneur du groupement phosphate, indispensable à la phosphorylation des sucres. Cette phosphorylation est réalisée en cinq étapes, successives et réversibles, réalisées par les phosphotransférases EI, HPr (Histidine-containing Protein), EIIA et EIIB, induisant le transfert du groupement phosphate (Figure 3) (Brückner & Rosenstein, 2006).

Le transfert du groupement phosphate débute par la phosphotransférase EI via le phosphoénolpyruvate, EI va ensuite phosphoryler HPr qui phosphorylera à son tour les

domaines protéiques EIIA et EIIB du complexe EII. Le carbohydrate est transloqué dans la cellule par EIIC, puis phosphorylé par EIIB (Figure 3) (Brückner & Rosenstein, 2006). Les enzymes EI et HPr sont des protéines cytoplasmiques solubles considérées comme les enzymes générales de ce système. Chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. carnosus* et *S. xylosus*, les gènes codant les protéines EI et HPr, PtsI et PtsH sont co-localisés (Eisermann *et al.*, 1991; Jankovic *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). Contrairement à EI et HPr, le complexe EII, composé de trois domaines protéiques, EIIA, EIIB, EIIC, et parfois d'un domaine EIID, est spécifique à un ou plusieurs hydrates de carbone. Les domaines protéiques EIIA et EIIB sont deux domaines membranaires périphériques et hydrophiles de taille identiques qui jouent un rôle de phosphotransférase. EIIC est le domaine transmembranaire qui catalyse le transport du sucre à travers la membrane. Le domaine EIID est un homologue du domaine EIIC (Brückner & Rosenstein, 2006).

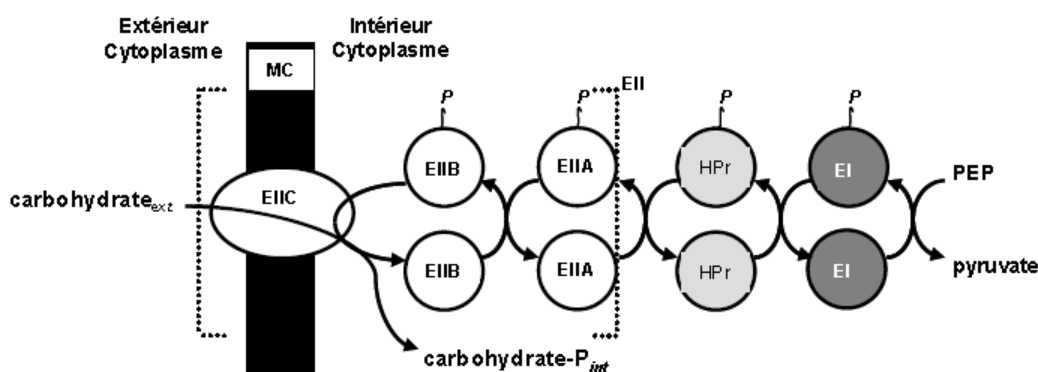


Figure 3: Le système PTS
D'après Brückner & Rosenstein, 2006

1.3 Le glucose

Afin d'assurer une assimilation efficace du glucose, deux principaux systèmes de transport existent chez les staphylocoques : l'un PTS indépendant, l'autre PTS dépendant.

Chez *S. xylosus*, un mécanisme indépendant du système PTS a été mis en avant (Fiegler *et al.*, 1999). Les gènes *glcU* et *glkA* sont impliqués dans l'assimilation du glucose chez *S. xylosus* (Wagner *et al.*, 1995 ; Fiegler *et al.*, 1999). Les gènes *glcU* et *glkA* codent respectivement une protéine d'assimilation du glucose GlcU et une glucose kinase GlkA. GlcU permet la translocation du glucose dans la bactérie. GlkA phosphoryle le glucose assimilé. La présence

d'homologues de ces deux gènes a été décrite sur d'autres génomes complets des staphylocoques (Brückner & Rosenstein, 2006). Chez *S. xylosus*, *S. carnosus* et *S. epidermidis*, le gène *gdh* codant une glucose déshydrogénase est en aval de *glcU* (Fiegler *et al.*, 1999). Cette co-localisation n'est pas observée dans les génomes de *S. aureus*. L'enzyme Gdh permet la formation de gluconate à partir de glucose et est co-exprimée avec GlcU. Cette co-expression laisse supposer que la bactérie utilise deux voies métaboliques en parallèle pour produire de l'énergie à partir du glucose (Figure 2) (Fiegler *et al.*, 1999).

Les seules données concernant le système PTS spécifique du glucose chez les staphylocoques concernent *S. carnosus*. Chez cette espèce, deux gènes positionnés en tandem, *glcA* et *glcB* ont été caractérisés (Christiansen & Hengstenberg, 1999). Les protéines GlcA/B sont identiques à 69% et possèdent une forte similarité avec les protéines EII glucose spécifiques de *Bacillus subtilis* et d'*Escherichia coli*. Ces deux protéines utilisent le glucose comme substrat majoritaire, mais une grande variété de glucosides peut également être assimilée par ces perméases (Christiansen & Hengstenberg, 1999). Immédiatement en amont de *glcA*, le gène *glcT* a été identifié chez *S. carnosus*. Une étude de l'activité de la protéine GlcT de *S. carnosus* a montré qu'elle pouvait provoquer une anti-terminaison (Knezevic *et al.*, 2000). *S. aureus* possède également deux perméases glucose spécifiques, mais leurs gènes respectifs ne sont pas organisés en tandem (Brückner & Rosenstein, 2006). Contrairement à *S. carnosus* et *S. aureus*, *S. epidermidis* semble avoir une seule perméase (Knobloch *et al.*, 2003).

1.4 Le saccharose et le lactose

Le transport du saccharose chez *S. xylosus* peut être réalisé soit via le système PTS soit via le système Scr.

Pour le système PTS, le saccharose entre dans la cellule sous forme de saccharose-6-phosphate qui sera hydrolysé en glucose-6-phosphate et fructose, deux composés qui entreront ensuite dans la voie glycolytique (Brückner & Rosenstein, 2006).

Concernant le système Scr, chez *S. xylosus*, quatre gènes permettent l'utilisation du saccharose (Brückner *et al.*, 1993). Le gène *scrA* codant une saccharose perméase a été caractérisée. Une fois le saccharose-6-phosphate internalisé, il est clivé par une saccharose phosphate hydrolase (sucrase) codée par le gène *scrB*, donnant ainsi du glucose-6-phosphate et du fructose (Bruckner *et al.*, 1993). Le fructose est ensuite phosphorylé par une fructokinase codée par *scrK* (Jankovic & Bruckner, 2007). Les gènes *scrB* et *scrK* sont co-

localisés et organisés en opéron. Le gène *scrA* est indépendant (Jankovic & Bruckner, 2007). L'expression des deux gènes *scrA* et *scrB* est induite par la concentration de saccharose présente dans le milieu. Cette régulation est sous la dépendance d'un répresseur codé par le gène *scrR*, localisé en amont du gène *scrB* (Gering *et al.*, 1996). L'utilisation du saccharose n'a été étudiée que chez *S. xylosus* au sein du genre *Staphylococcus*.

La voie métabolique du lactose n'est pas universelle chez les staphylocoques. En effet chez *S. xylosus*, l'assimilation du lactose diffère de celle observée chez *S. aureus*. Chez *S. aureus*, le lactose est assimilé via un système PTS et le lactose-6-phosphate est clivé par une phospho- β -galactosidase pour donner une molécule de galactose-6-phosphate et du glucose (Breidt & Stewart, 1987). Chez *S. xylosus*, le lactose est assimilé, non phosphorylé, par une lactose perméase appartenant à la famille des protéines GPH qui transportent les galactosides et les pentoses (Poolman *et al.*, 1996). Chez *S. xylosus*, le système intervenant dans l'utilisation du lactose a été caractérisé. Il comprend deux gènes *lacP* et *lacH* qui codent respectivement pour une lactose perméase et une β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Un gène régulateur *lacR* est positionné en amont de l'opéron et orienté de façon opposée à l'opéron *lacPH* (Bassias & Brückner, 1998).

1.5 La répression catabolique du carbone

Le terme de répression catabolique du carbone (RCC) est utilisé pour désigner un phénomène général chez les micro-organismes qui consiste à la répression de l'expression de certains gènes ou opérons par la présence d'une source de carbone dans un milieu, les produits de ces gènes étant très souvent liés à l'utilisation de sources de carbone alternatives (Brückner & Titgemeyer, 2002; Saier *et al.*, 1996). Si plus d'un carbohydrate est présent dans le milieu de culture, la bactérie s'adapte et n'utilise qu'une seule source de carbone à la fois et laisse l'autre substrat dans le milieu pour une utilisation future. Chez les staphylocoques, le glucose est une source de carbone privilégiée et de nombreuses publications mentionnent l'influence de ce sucre sur le contenu en cytochrome et dans de nombreux procédés cellulaires tels que l'utilisation de sources de carbone alternatives, la production d'enzymes extracellulaires et l'activité des enzymes glycolytiques (Brückner & Rosenstein, 2006).

L'activation des systèmes globaux de contrôle de transcription, en réponse à la disponibilité en hydrates de carbone d'un milieu, est le mécanisme le plus étudié dans la RCC. La RCC CcpA- et HPrK-dépendante a été analysée en détail chez *S. xylosus* (Jankovic *et al.*, 2001;

Jankovic & Bruckner, 2007) (Figure 4). La protéine CcpA est une protéine centrale dans la répression catabolique du carbone (Henkin, 1996). Cette protéine est un membre de la famille des facteurs de transcription de type GalR-LacI (Henkin, 1996). Elle fonctionne principalement comme un répresseur de transcription, mais son implication dans l'activation de certains gènes a également été décrite. Ce régulateur nécessite la présence du co-répresseur P-Ser-HPr pour se fixer sur la séquence opératrice *cre* («catabolite responsive element»). La kinase phosphorylase HPrK bifonctionnelle phosphoryle HPr en présence d'ATP et de fructose-1,6-diphosphate, un intermédiaire catabolique (Kravanja *et al.*, 1999).

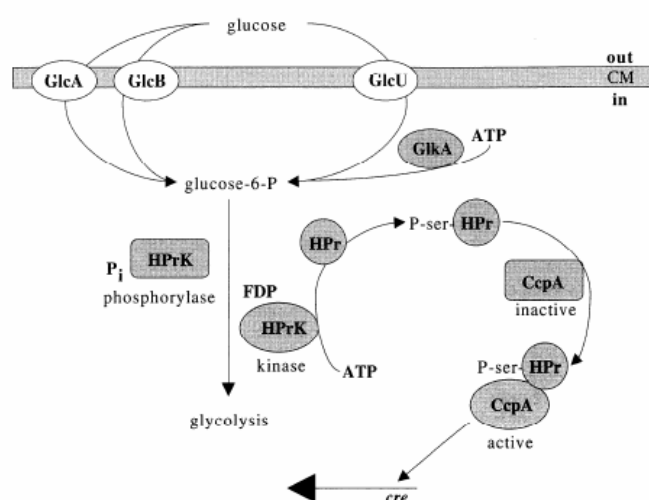


Figure 4: La répression catabolique du glucose par la protéine CcpA chez les staphylocoques (Brückner & Rosenstein, 2006)

2. LE METABOLISME DES LIPIDES ET DES ACIDES GRAS

Les lipides du saucisson proviennent principalement du tissu adipeux (1/3 de la matière première) et dans une plus faible proportion du tissu musculaire. Les lipides du tissu adipeux sont surtout représentés par des triglycérides composés des acides gras suivants : 1,5 % d'acide myristique, 25 % d'acide palmitique, 14 % d'acide stéarique, 3 % d'acide palmitoléique, 43 % d'acide oléique, 11 % d'acide linoléique et 1 % d'acide linolénique (Ordonez *et al.*, 1999). Les lipides du tissu musculaire sont majoritairement des triglycérides (62 à 80 %) et des phospholipides (16 à 34 %) (Ordoñez *et al.*, 1999). Les triglycérides et les phospholipides sont dégradés dans les saucissons via des réactions de lipolyse et d'oxydation (Figure 5).

2.1 La lipolyse

La lipolyse est l'hydrolyse partielle ou complète des esters liés aux triglycérides et aux phospholipides. Elle entraîne l'augmentation de la concentration des acides gras libres et des diglycérides. Les lipides sont majoritairement hydrolysés par des lipases microbiennes ou tissulaires. Il existe deux types de lipases endogènes : les triglycérides lipases présentes dans le muscle et dans le tissu adipeux qui sont actives sur les triglycérides et les phospholipases qui hydrolysent les phospholipides et dont le pH optimum (5,5) est proche de celui du saucisson (Shadbolt *et al.*, 2001) (Figure 5).

S. xylosus possède une activité lipolytique permettant la dégradation des lipides et plus particulièrement ceux à longue chaîne en acides gras libres (Kenneally *et al.*, 1998). Cette activité lipolytique est maximale à 30°C et à pH 7 chez *S. xylosus* (Talon *et al.*, 2002) alors qu'elle est maximale à pH 8 pour *S. warneri* (Talon *et al.*, 1995) et pH 8.5 pour *S. hyicus* (van Oort *et al.*, 1989). Il est cependant important de noter que la fermentation du saucisson a généralement lieu à des pH plus acides (5-5,8) et des températures plus basses (18-25°C) ce qui pourrait minimiser l'activité lipolytique de *S. xylosus* (Talon *et al.*, 2002).

Chez *S. xylosus*, deux lipases différentes ont été décrites: GehM et SXL (Mosbah *et al.*, 2005; Sakinc *et al.*, 2005). La première lipase détectée chez *S. xylosus* a été GehM par analogie de séquence avec la lipase Ssp de *S. saprophyticus* (Sakinc *et al.*, 2005). Chez *S. xylosus*, il a été montré que lorsque l'on augmentait le contenu en triglycéride dans un milieu de culture, l'expression du gène *gehM* était réduite (Iacumin *et al.*, 2007). Chez *S. xylosus*, la lipase GehM est thermostable et son activité est maximale à pH 9 et 42°C (Brod *et al.*, 2010). La lipase SXL de *S. xylosus* est la mieux caractérisée (Mosbah *et al.*, 2005). Cette lipase est excrétée par *S. xylosus* dans le milieu de culture. Elle n'est pas induite par la présence d'acides gras à chaînes longues ou courtes, est monomérique et a une masse moléculaire de 43 kDa. Elle est thermostable et son activité est maximale à 45°C. SXL s'est avérée être la lipase staphylococcique la plus active sur une émulsion de trioléine, un lipide composé de longues chaînes d'acides gras (Mosbah *et al.*, 2005). D'un point de vue moléculaire, le gène codant cette lipase a été séquencé et la séquence protéique mature correspondante n'a montré que 53% de similarité avec GehM mais 99,7% avec la lipase de *S. simulans* (Mosbah *et al.*, 2005).

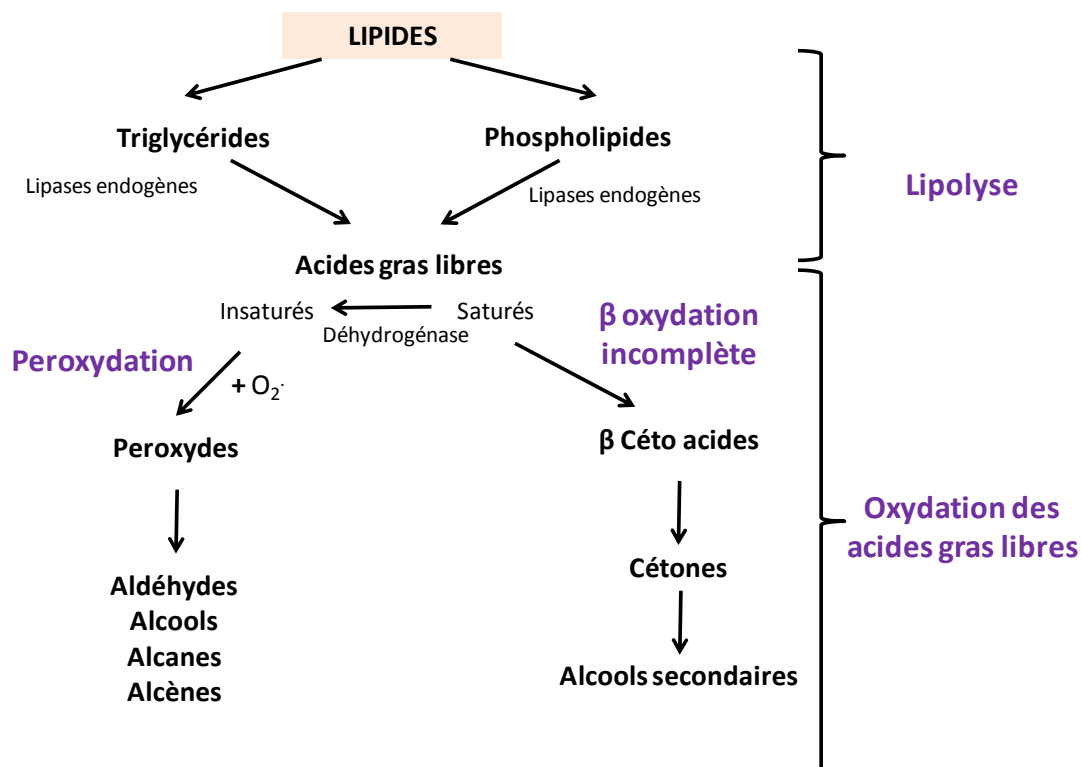


Figure 5: Métabolisme des lipides

2.2 L'oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras dans le saucisson est responsable de la production de nombreux composés participant à l'arôme des salaisons mais ces composés en excès peuvent altérer les qualités sensorielles. L'oxydation des acides gras peut être enzymatique (β -oxydation) ou chimique (peroxydation).

La β -oxydation est une succession de réactions enzymatiques qui dégrade les acides gras saturés en acide acétique par éliminations successives de groupement acétyl CoA. Au cours du cycle de β -oxydation, des β -céto acides peuvent être libérés par une thioestérase puis catabolisés en cétones puis en alcools secondaires sous l'action d'une décarboxylase et d'une déshydrogénase, respectivement (Figure 5). Il a été montré que l'inoculation de *S. carnosus* ou *S. xylosus* conduit à des saucissons enrichis en méthyl cétones (Montel *et al.*, 1996). *S. carnosus* possède des activités de β -oxydation et thioestérase qui sont induites par des méthyl-esters de longues chaînes (Engelvin *et al.*, 2000).

Une activité décarboxylase a été mise en évidence chez *S. carnosus*, elle est présente durant toutes les phases de croissance (Fadda *et al.*, 2002). Cette étude a également montré que l'oxygène, un pH de 5 et la présence de nitrate peuvent augmenter la production de méthyl

cétones. La β -oxydation et l'activité décarboxylase ont été mises en évidence chez *S. xylosus* par ces mêmes auteurs.

La peroxydation est une réaction chimique entre les composés actifs de l'oxygène (O_2 , H_2O_2 , OH) et les acides gras insaturés. Ce processus aboutit à des hydroperoxydes, substrats pour la formation d'autres radicaux (RO , ROO , etc) qui se propagent par des réactions en chaîne pour former des peroxydes. La condensation de deux radicaux libres entraîne la formation de produits secondaires d'oxydation (aldéhydes, alcools, alcanes et alcènes) (Figure 5). Les aldéhydes participent à l'arôme des salaisons, mais produits en quantité importante, ils altèrent les propriétés sensorielles du produit en contribuant au rancissement (Morrissey *et al.*, 1998). Les staphylocoques via leurs propriétés anti-oxydantes jouent un rôle dans le contrôle de l'oxydation (Barrière *et al.*, 2001b). Il a été montré que différentes souches de *S. xylosus* inhibaient l'oxydation des acides gras, comme l'acide linoléique, un acide gras insaturé libéré lors de la lipolyse (Talon *et al.*, 2002). Cette inhibition est réalisée via des activités superoxyde dismutase et catalase (Barrière *et al.*, 2001b).

2.3 Superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases (SODs) sont des métallo-enzymes, classées en fonction de leur métal cofacteur. Il y a quatre grandes classes de SODs chez les bactéries, les SODs à manganèse (MnSOD), les SODs à fer (FeSOD), les SODs à nickel (NiSOD) et les SODs à cuivre et zinc (CuZnSOD) (Barrière *et al.*, 2001a). La plupart des souches de *S. aureus*, possèdent deux SODs. L'enzyme majeure, SodA, une MnSOD, est inductible (Clements *et al.*, 1999). La seconde SOD, une autre MnSOD moins étudiée, est codée par le gène *sodM* (Valderas *et al.*, 2002). Elle est exprimée de manière constitutive et son activité est maximale en fin de phase exponentielle. Le gène *sodM* n'a été identifié que chez l'espèce *S. aureus* (Valderas *et al.*, 2002). *S. xylosus* contient une seule SOD, de type MnSOD (Barrière *et al.*, 2001b). Sa séquence en acides aminés montre une grande similarité avec l'enzyme SodA de *S. aureus*. Elle n'est pas inhibée par le peroxyde d'hydrogène, et le manganèse est nécessaire pour le maintien de son activité en phase stationnaire (Barrière *et al.*, 2001a). En milieu riche, l'expression du gène *sodA* chez *S. xylosus* est induite en phase stationnaire de croissance, comme observée chez *S. aureus* (Barrière *et al.*, 2001b). Cependant, aucune induction n'a pu être observée dans un milieu chimiquement défini. Chez *S. xylosus*, le manganèse ne joue aucun rôle au niveau transcriptionnel, il paraît être nécessaire uniquement à l'étape post-

transcriptionnelle, lors de l'insertion du métal dans le site actif. Le gène *sodA* n'est pas essentiel à la croissance aérobie de *S. xylosus*, laissant supposer la présence d'autres mécanismes de protection (Barrière *et al.*, 2001b). Le mutant de délétion de ce gène montre, en plus d'une perte totale d'activité SOD, un phénotype sensible aux hautes pressions en O₂ et au paraquat, substance qui génère des radicaux superoxydes (Barrière *et al.*, 2001b).

2.4 Catalase

Les catalases catalysent la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Elles jouent un rôle très important en réduisant la formation de radicaux hydroxyles hautement réactifs qui résultent de la transformation de H₂O₂ via la réaction de Fenton (Jang & Imlay, 2007). Les catalases sont divisées en trois groupes suivant les propriétés et la séquence des enzymes (Mayfield & Duvall, 1996; von Ossowski *et al.*, 1993). Le premier groupe comprend des catalases monofonctionnelles de masses moléculaires moyennes comprises entre 220–350 kDa, elles sont formées par 4 sous-unités identiques, chacune contenant un groupe proto-hème. Le second groupe comprend des catalases bifonctionnelles ayant à la fois une activité catalase et peroxydase. Le troisième groupe est constitué par des catalases sans hème ou des catalases de type manganèse. Dans le genre *Staphylococcus*, toutes les espèces sont catalase positive exceptées *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subspecies *anaerobius* (Gaupp *et al.*, 2012). La majorité des staphylocoques a une catalase unique comme chez *S. aureus* (Gaupp *et al.*, 2012). Cependant, la souche TM300 de *S. carnosus* a deux catalases (Rosenstein *et al.*, 2009). Certaines souches de *S. xylosus*, *S. saprophyticus* et *S. equorum* ont été décrites comme ayant deux catalases (Blaiotta *et al.*, 2010). Chez la souche *S. xylosus* C2a, trois catalases ont été identifiées. Ces trois catalases appartiennent au groupe des catalases monofonctionnelles. Barrière *et al.* (2002) ont d'abord identifié KatA. Cette étude a montré que l'expression du gène *katA* était induite en phase stationnaire par l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène. L'expression de ce gène est réprimée par le fer et le manganèse (Barrière *et al.*, 2002). Le mutant de délétion du gène *katA* a montré qu'il possédait toujours une activité catalase importante laissant suggérer que cette souche possédait au moins une autre enzyme responsable de cette activité (Barrière *et al.*, 2002). En analysant les protéomes de *S. xylosus* C2a, deux autres catalases ont été retrouvées et nommées KatB et KatC (Planchon *et al.*, 2007; Planchon *et al.*, 2009).

3. LE METABOLISME DES PROTEINES ET ACIDES AMINES

La matière première de la viande est composée d'environ 70 % de tissu musculaire, principale source de composés azotés. Les protéines musculaires sont divisées en 3 groupes : les protéines sarcoplasmiques (enzymes de la glycolyse, pigments, protéines des organites cellulaires), les protéines myofibrillaires (actine, myosine) et les protéines du tissu conjonctif (collagène, élastine). Le catabolisme des protéines est constitué de deux principales étapes : la protéolyse qui englobe la dégradation des protéines en peptides et celle des peptides en acides aminés et le catabolisme des acides aminés (Figure 6) (Talon *et al.*, 2002).

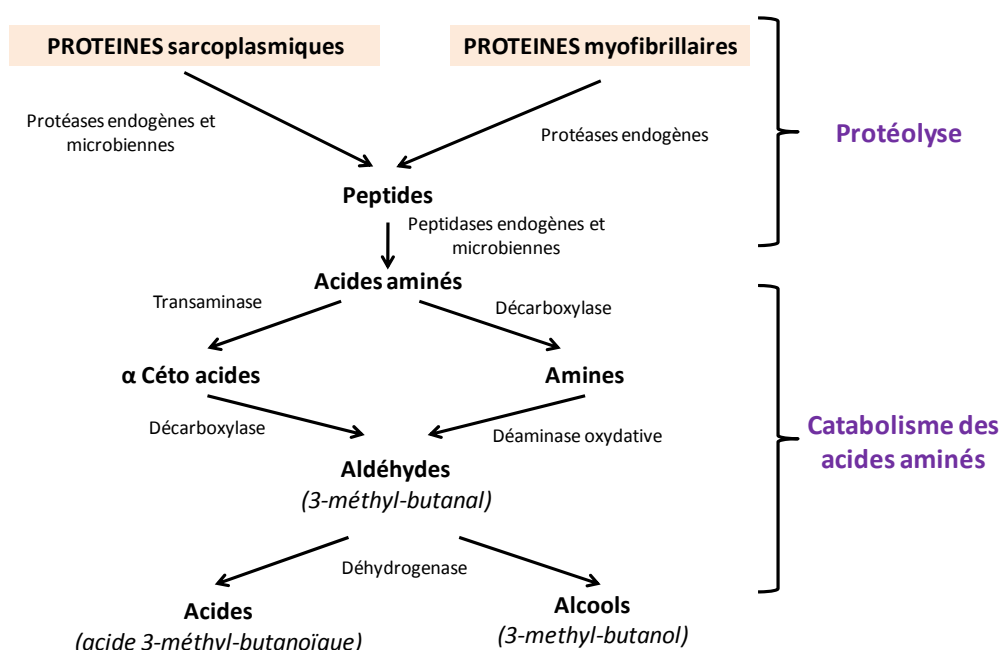


Figure 6: Métabolisme des protéines et acides aminés

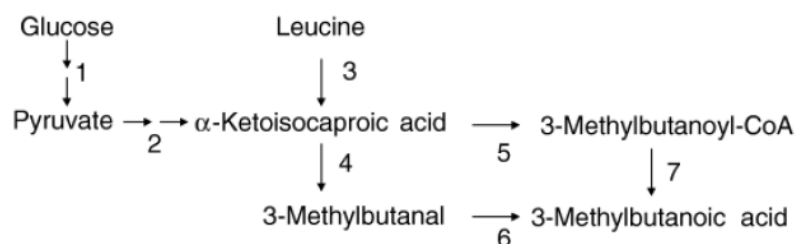
3.1 La protéolyse

Au cours de la maturation du saucisson, la fraction protéique est diminuée de moitié après 40 jours de maturation sous l'effet de l'hydrolyse des protéines en polypeptides, peptides et acides aminés (Talon *et al.*, 2002). La protéolyse est due essentiellement aux enzymes tissulaires endogènes, elle se traduit par une augmentation des teneurs en azote total non protéique et en acides aminés libres (Figure 6). Cependant, des souches de *S. xylosus* isolées de produits carnés fermentés ont montré une faible activité protéolytique sur les protéines

myofibrillaires, tandis que certaines souches ont été impliquées dans l'hydrolyse des protéines sarcoplasmiques (Miralles *et al.*, 1996). Une étude sur des saucissons inoculés avec des bactéries lactiques et des staphylocoques en présence ou non d'antibiotiques a montré qu'en présence d'antibiotiques, la concentration en acides aminés libres n'était que faiblement diminuée (Molly *et al.*, 1997). La dégradation des peptides en acides aminés est due en partie aux bactéries (40%), le reste étant attribué aux enzymes endogènes (Molly *et al.*, 1997).

3.2 Le catabolisme des acides aminés

Il a été démontré, principalement dans les produits carnés fermentés, que le microbiote et principalement les staphylocoques, participaient activement au catabolisme des acides aminés. Les acides aminés peuvent être transformés en molécules odorantes comme des aldéhydes, des acides et des alcools (Figure 6) (Talon *et al.*, 2002). *S. xylosus* synthétise des taux élevés de 3-méthyl butanal, qui donne une note aromatique maltée cacaotée, lorsqu'il est inoculé dans un saucisson (Stahnke, 1999). Cette molécule est un des métabolites du catabolisme de la leucine. Ce catabolisme a été étudié par Beck *et al.* (2004) qui ont montré chez *S. xylosus* que le dérivé majeur du catabolisme de la leucine était l'acide 3-méthyl butanoïque (odeur de pied) (Figure 7). La production de cet acide est initiée en phase stationnaire de croissance. Son précurseur immédiat est le 3-méthyl butanal, qui ne serait présent que de façon transitoire en phase exponentielle de croissance (Beck *et al.*, 2004). Quand *S. xylosus* entre en phase stationnaire, les aldéhydes à chaîne latérale ramifiée sont convertis en acides carboxyliques correspondants (Figure 7).



Les enzymes impliquées sont les enzymes glycolytiques (1); des enzymes de la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine (2); une transaminase (3); une décarboxylase de cétoacide à chaîne latérale ramifiée (4); une déshydrogénase de cétoacide à chaîne latérale ramifiée (5); une aldéhyde déshydrogénase (6); une acyl-CoA hydrolase ou une phosphate butyrate CoA transférase et une butyrate kinase (7)

Figure 7: Voie proposée par Beck *et al* (2004) pour la dégradation du glucose et de la leucine chez *S. xylosus*

Certains paramètres comme la température, le pH, la concentration en sel ou en nitrate/nitrite peuvent moduler le catabolisme de la leucine chez les staphylocoques et ainsi la proportion en aldéhyde, alcool et acide. Il a été montré chez *S. xylosus* et *S. carnosus* qu'une augmentation de la température de 15 à 25°C augmentait la production d'acide 3-méthyl butanoïque et de 3-méthyl butanol mais diminuait la production de 3-méthyl butanal (Olesen *et al.*, 2004a; Tjener *et al.*, 2004). Ces résultats concernant l'effet de la température sur ces deux espèces n'ont toutefois pas été confirmés par Ravyts *et al.* (2009). Une diminution de pH (6 à 5) augmentait la production de 3-méthyl-butanol chez *S. xylosus* et *S. carnosus* (Olesen *et al.*, 2004a; Ravyts *et al.*, 2009). Une augmentation de la concentration en sel a augmenté la concentration de 3-méthyl butanal chez ces espèces alors qu'elle diminuait la production d'acide 3-méthyl butanoïque et de 3-méthyl butanol (Olesen *et al.*, 2004a; Tjener *et al.*, 2004). Enfin chez *S. carnosus*, les nitrates et nitrites ont entraîné une diminution de la production de 3-méthyl butanal, d'acide 3-méthyl butanoïque et de 3-méthyl butanol (Masson *et al.*, 1999).

-CHAPITRE 3–

Catabolisme des composés nitrosés chez les staphylocoques

L'utilisation du nitrite et nitrate en agro-alimentaire est communément appelée « curing », terme signifiant traiter ou restaurer. Dès le début du 19^{ème} siècle les propriétés du salpêtre (ou KNO_3) sont reconnues pour améliorer la préservation et assurer une couleur adéquate aux produits carnés. En 1891, Polenske a montré que le nitrite pouvait être produit à partir de nitrate sous l'action de microorganismes. Puis Lehmann (1899) et Kisskalt (1899) ont finalement confirmé que seul le nitrite était responsable de la couleur rouge et stable de la viande. Le rôle des composés nitrosés dans la couleur des produits carnés fermentés est donc connu depuis le début du 20^{ème} siècle.

Depuis, le nitrite et le nitrate sont couramment ajoutés comme additifs dans le processus de fabrication de nombreux produits carnés fermentés. Cependant le nitrite est un composé toxique, la toxicité du nitrate étant due à sa réduction en nitrite. Pour un homme de 70 kg, la dose orale létale moyenne est établie à 30 g de nitrate et 10 g de nitrite (Honikel, 2008). De ce fait leur addition est strictement réglementée par la directive 2006/52/EC qui fixe à 150 mg de nitrite et 300 mg de nitrate par kg pour les produits carnés fermentés. Les quantités résiduelles dans les produits doivent être inférieures à 50 mg nitrite/kg et 250 mg de nitrate/kg dans les produits carnés séchés.

La dégradation des nitrates et des nitrites dans les produits carnés est le résultat des activités enzymatiques des staphylocoques mais aussi de nombreuses réactions chimiques en interactions notamment avec les pigments de la viande (Figure 8). Ces réactions enzymatiques et chimiques dépendent du pH, de la concentration en pigment, du potentiel redox et de la température (Chasco *et al.*, 1996).

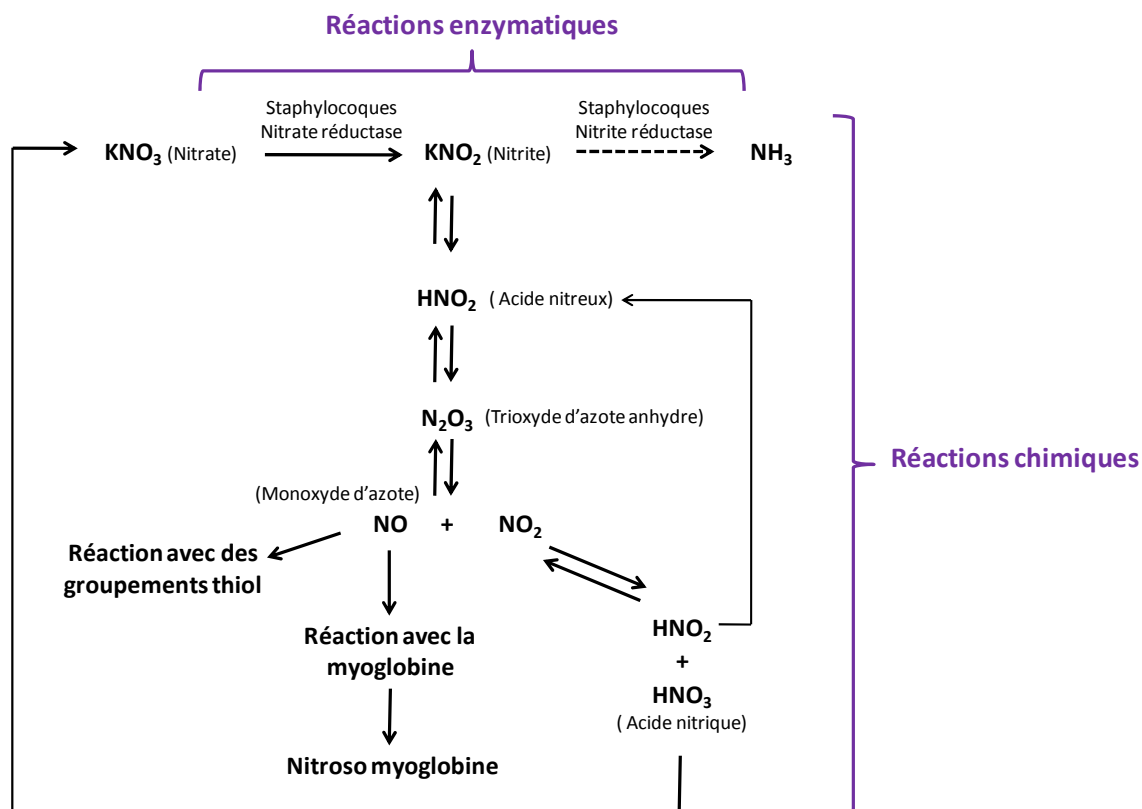


Figure 8 : Réactions simplifiées des nitrates et des nitrites dans un produit carné fermenté (D'après Honikel 2008)

1. ROLE DES NITRATES ET DES NITRITES DANS LES PRODUITS CARNES

Le nitrate est réduit en nitrite par la nitrate réductase des staphylocoques comme nous le détaillerons ultérieurement. Le nitrite apporté sous forme de sel (KNO_2) se dissout du fait de sa bonne solubilité à pH 5.5 dans l'eau contenue dans la viande (Figure 8) (Honikel, 2008). Près de 99% du nitrite existant à pH 5.5 se retrouve sous la forme anionique NO_2^- . La faible proportion d'acide nitreux (HNO_2) est en équilibre avec du trioxyde d'azote anhydre (N_2O_3) lui même en équilibre avec du monoxyde d'azote (NO) et du dioxyde d'azote (NO_2). Le NO_2 peut réagir avec de l'eau formant ainsi du HNO_3 . Le HNO_2 et le HNO_3 peuvent ainsi réalimenter le système (Figure 8).

La molécule de NO formée peut réagir avec différentes molécules comme des acides aminés à groupement thiol (cystéine) ou la glutathione et avec le principal pigment de la viande la myoglobine. La myoglobine existe dans le muscle sous 3 états selon les interactions de l'hème qui lui est associé avec l'oxygène et le fer. En absence d'oxygène, son hème est lié à du Fe^{2+}

et la myoglobine (Mb) a une couleur rosée. En présence d'oxygène, le Fe^{2+} capte un atome d' O_2 conduisant à l'oxymyoglobine (MbO_2) de couleur rouge. L'oxygène va ensuite oxyder le fer qui va former du Fe^{3+} : ceci conduit à la metmyoglobine (MetMb) qui a une couleur marron. Les formes Mb, MbO_2 et MetMb se retrouvent de façon concomitante dans la viande. Le NO provenant de la dégradation des nitrites se lie à l'hème de la myoglobine, majoritairement sous la forme oxymyoglobine, pour former la nitrosomyoglobine, un composé stable et rouge, responsable de la couleur typique des salaisons (Honikel, 2008; Moller & Skibsted, 2002).

En chélatant de façon indirecte l'oxygène, le nitrite a une action anti oxydante dans la mêlée de la viande. Il a été montré par ailleurs que le nitrite pouvait limiter l'oxydation des lipides par plusieurs mécanismes indirects (Igene *et al.*, 1985). Le NO peut agir en se complexant à l'hème et ainsi prévenir la libération du fer, en interagissant avec du fer non hémique et/ou en protégeant les lipides oléfiniques de l'oxydation (Igene *et al.*, 1985).

2. LE CATABOLISME DES COMPOSES NITROSES PAR LES STAPHYLOCOQUES

Le catabolisme des nitrates et des nitrites a été particulièrement bien étudié chez *S. carnosus* (Neubauer & Götz, 1996). Le nitrate est réduit en ammoniacque sous l'action de deux enzymes (Figure 9). Le nitrate est importé du milieu de culture par la bactérie puis réduit en nitrite par une nitrate réductase. Le nitrite est ensuite excrété. Lorsque la concentration en nitrate devient limitée, le nitrite est réimporté par la bactérie et réduit en ammoniacque par une nitrite réductase. Les transporteurs membranaires du nitrite et de l'ammoniacque sont encore mal identifiés. La nitrate réductase est une enzyme membranaire nécessitant de l'énergie et est impliquée dans les mécanismes respiratoires tandis que la nitrite réductase est une enzyme cytosolique impliquée dans la réoxydation du NADH (Neubauer & Götz, 1996).

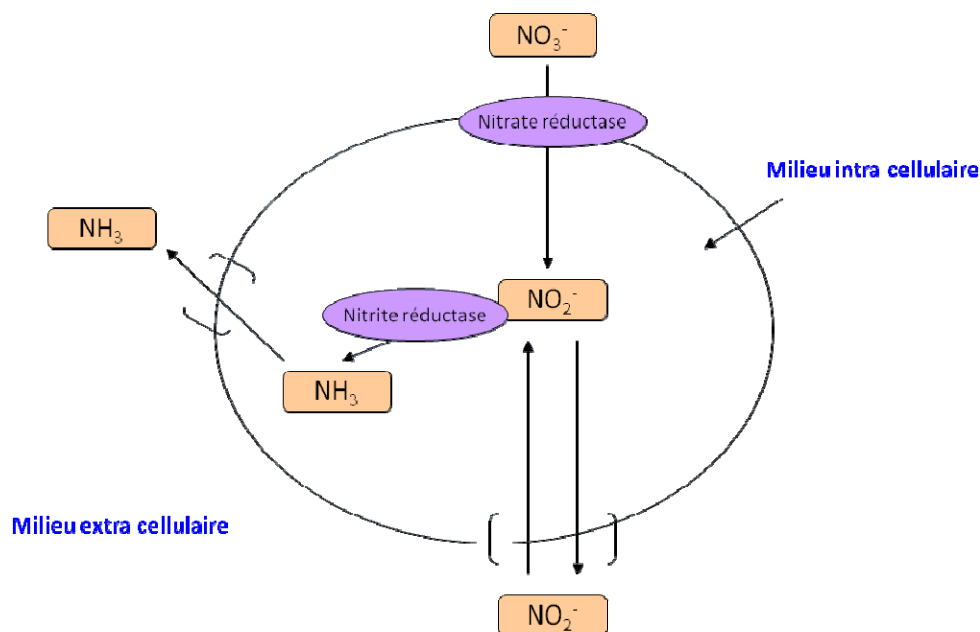


Figure 9: Représentation schématique de la réduction du nitrate et du nitrite chez *S. carnosus* (D'après Neubauer & Götz, 1996)

2.1 La nitrate réductase

2.1.1 L'activité nitrate réductase

La première étude portant sur l'activité nitrate réductase chez un staphylocoque a été réalisée chez *S. aureus* (Burke & Lascelles, 1975). La nitrate réductase présente chez la souche SG 511 de *S. aureus* possède les caractéristiques d'une enzyme de type respiratoire en étant inhibée par du cyanure et de l'azide de sodium (Burke & Lascelles, 1975). La nitrate réductase respiratoire est la seule retrouvée chez les staphylocoques (Pantel *et al.*, 1998). La nitrate reductase d'assimilation codée par le cluster *nas* et la nitrate réductase de désassimilation codée par le cluster *nap* présentes chez d'autres bactéries Gram + et Gram – ne sont en effet pas retrouvées chez les staphylocoques (Morozkina & Zvyagilskaya, 2007).

La capacité à réduire le nitrate est communément répandue chez les staphylocoques. Diverses études ont été réalisées afin d'évaluer leur activité nitrate réductase. La première étude sur les staphylocoques a porté sur trois souches de *S. xylosus* et une souche de *S. epidermidis*, elle a révélé que ces souches étaient capables de réduire le nitrate en nitrite (Miralles *et al.*, 1996). Une étude a montré que sur les 96 souches de staphylocoques isolées de saucissons italiens, la plupart des souches de *S. xylosus*, *S. equorum* et *S. lentus* étaient capables de réduire le nitrate

en nitrite à 30°C. Cependant cette activité était retrouvée de façon beaucoup plus sporadique chez *S. saprophyticus*, *S. succinus* et *S. warneri* (Mauriello *et al.*, 2004). Casaburi *et al* (2005) ont mis en évidence une activité nitrate réductase chez quatre souches de *S. carnosus* et deux souches de *S. simulans*. Finalement, Götterup *et al* (2007) ont étudié 11 souches de staphylocoques appartenant aux espèces *S. succinus*, *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. carnosus*. Toutes les souches testées, exceptées celles de *S. saprophyticus*, possédaient une activité nitrate réductase.

Les études de Burke & lascelles (1975) sur *S. aureus*, de Neubaueur & Götz (1996) sur *S. carnosus*, et Miralles (1996) sur *S. xylosus* et *S. epidermidis*, montrent que le nitrate favorise la croissance des staphylocoques en anaérobiose. Des résultats similaires ont été retrouvés chez *S. carnosus*, *S. xylosus*, *S. warneri* et *S. saprophyticus* (Talon *et al.*, 1999). Cette étude a mis en évidence qu'en limitation d'oxygène, la synthèse de la nitrate réductase est maximale durant la phase exponentielle de croissance alors qu'en aérobiose, cette synthèse est maximale en début de phase stationnaire. De plus l'addition de nitrate dans le milieu de culture multipliait par cinq la synthèse de nitrate réductase chez *S. carnosus*, cet effet est cependant moindre chez *S. xylosus* et absent chez *S. saprophyticus* (Talon *et al.*, 1999).

L'activité nitrate réductase s'avère espèce-dépendante allant de 41 à 796 nmol/min/mL chez les 11 souches de staphylocoques citées ci-dessus (Götterup *et al.*, 2007). Plusieurs paramètres peuvent moduler cette activité comme la présence de molybdène ou la température. Burke & Lascelles en 1975 ont ainsi montré que le molybdène jouait un rôle indispensable comme cofacteur de l'activité nitrate réductase de *S. aureus*. Une autre étude a montré que l'activité nitrate réductase ne variait pas entre 18°C (température d'affinage) et 30°C chez 80 souches de staphylocoques isolées de saucissons italiens (Coppola *et al.*, 1997). De plus chez 2 souches de *S. simulans* et 4 souches de *S. carnosus*, le nitrite est principalement relargué à 30°C (Casaburi *et al.*, 2005).

2.1.2 L'opéron *nar*

L'opéron *nar* est particulièrement bien décrit chez *S. carnosus* (Pantel *et al.*, 1998). Ces auteurs ont montré que la séquence de quatre gènes de l'opéron *nar* montrait une identité avec les gènes codant la nitrate réductase respiratoire de *Bacillus subtilis* et *E. coli* (Dubourdieu & DeMoss, 1992; Hoffmann *et al.*, 1995; Nakano & Zuber, 1998). Par comparaison ces gènes ont donc été appelés *narGHIJ*. Ils sont organisés en une seule unité transcriptionnelle et se

chevauchent (Pantel *et al.*, 1998). Pour les quatre gènes, une séquence putative de Shine-Dalgarno est présente en amont de la séquence codante. A la fin de l'opéron, le signal de terminaison de la transcription est absent. Une région promotrice putative est retrouvée 260 nucléotides en amont de l'opéron *narGHJI* (Figure 10) (Pantel *et al.*, 1998).

L'opéron *nar* est composé de quatre gènes codant les sous unités α , β , δ , et γ de la nitrate réductase (Pantel *et al.*, 1998). Le premier gène, *narG*, code le polypeptide α de 138,4 kDa qui possède un site de liaison au molybdène servant de cofacteur. Le gène *narH* code un polypeptide de 59.9 kDa qui forme la sous unité β de la nitrate réductase respiratoire. Elle possède 4 clusters cystéines et sert de transfert d'électrons (Pantel *et al.*, 1998). La protéine NarJ ou sous unité δ , codée par le gène *narJ*, avec une masse moléculaire de 22.6 kDa, montre le degré le plus faible d'identité avec la sous unité protéique correspondante chez *E. coli* et *B. subtilis*. Cette protéine est décrite chez *E. coli* comme une unité d'assemblage n'ayant pas d'activité nitrate réductase mais étant essentielle pour la réduction des nitrates (Blasco *et al.*, 1992). Afin de vérifier si NarJ était également indispensable chez *S. carnosus*, Pantel *et al.* (1998) ont obtenu un mutant par insertion d'un transposon en amont de la séquence du gène *narJ* de la souche *S. carnosus* TM300. Ce mutant perd la capacité à réduire le nitrate. Ceci laisse supposer que la protéine NarJ est également essentielle à l'activité nitrate réductase. Le quatrième cadre de lecture, *narI*, code le polypeptide NarI ou sous unité γ , qui a une masse moléculaire de 26.4 kDa. La prédiction de la structure protéique suggère que NarI est une protéine de membrane avec cinq segments transmembranaires. Quatre résidus histidines et un résidu proline sont conservés dans la protéine NarI de *S. carnosus* tout comme chez *E. coli* et *B. subtilis* (Dubourdieu & DeMoss, 1992; Hoffmann *et al.*, 1995; Nakano & Zuber, 1998). Pantel *et al.* (1998) ont également obtenu un mutant par insertion d'un transposon dans le gène *narI* de la souche *S. carnosus* TM300. Ce mutant perd la capacité à réduire le nitrate.

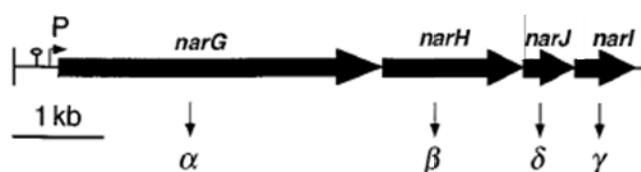


Figure 10: L'opéron *nar* chez *Staphylococcus carnosus* (Pantel *et al.*, 1998)

Morozkina & Zvyagilskaya (2007) ont proposé un modèle de réduction du nitrate par la nitrate réductase chez les bactéries Gram négatives. Ce modèle pourrait s'appliquer à *S. carnosus* (Figure 11). La protéine NarI ancrerait les protéines NarH et NarG dans la membrane. Les protéines NarH et NarG agissent de façon synergique pour réduire le nitrate en nitrite en incorporant des clusters Fe-S et en se servant du molybdène comme cofacteur. La fonction exacte de la protéine NarJ reste à déterminer (Morozkina & Zvyagilskaya, 2007). La membrane cytoplasmique est ainsi le siège d'une plus forte activité nitrate réductase (Morozkina & Zvyagilskaya, 2007). Ce résultat a également été observé chez *S. carnosus* (Neubauer & Götz, 1996).

Les études de Morozkina & Zvyagilskaya (2007) et Pantel *et al* (1998) suggèrent que l'oxygène est le régulateur prédominant de la synthèse de la nitrate réductase. En effet quand l'oxygène diminue et que la densité cellulaire augmente, la transcription de *narGHJ* est induite. L'opéron est aussi modulé par la présence de nitrate et de nitrite.

Un autre gène en aval de l'opéron *nar* a été identifié chez *S. carnosus* et *S. aureus* et pourrait intervenir dans la synthèse de la nitrate réductase (Fast *et al.*, 1996; Schlag *et al.*, 2008). Ce gène appelé *narT* chez *S. carnosus* et *nark* chez *S. aureus*, code une protéine transmembranaire de 42 kDa qui montre des similarités avec la protéine de transport NarK de *B. subtilis* et *E. coli* (Fast *et al.*, 1996; Schlag *et al.*, 2008). NarT jouerait un rôle dans l'import du nitrate et l'export du nitrite (Fast *et al.*, 1996).

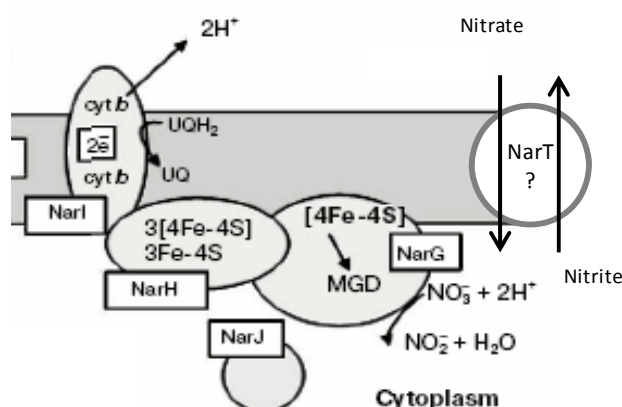


Figure 11: Modèle de la réduction du nitrate par la nitrate réductase chez les staphylocoques
(D'après Morozkina & Zvyagilskaya, 2007)

2.2 La nitrite réductase

2.2.1 L'activité nitrite réductase

La réduction du nitrite par les staphylocoques a d'abord été étudiée par Hartmann *et al* (1995). Ils ont montré que dix souches de *Staphylococcus piscifermentans*, seize souches de *S. carnosus*, une souche de *S. aureus*, une de *S. epidermidis* et une de *S. xylosus* étaient capables de réduire le nitrite. Ils ont aussi montré en travaillant plus particulièrement sur deux de ces souches, qu'une souche de *S. carnosus* et une de *S. piscifermentans* convertissaient le nitrite en ammoniac (Hartmann *et al.*, 1995). Gøtterup *et al* (2007) ont étudié par la suite, l'activité nitrite réductase de 11 souches de staphylocoques (*S. succinus*, *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. stimulans*, *S. sciuri*, *S. carnosus*). Toutes les souches testées possédaient une activité nitrite réductase allant de 4 à 42 nmol/min/mL, exceptées celles de *S. xylosus* et de *S. equorum* qui n'en possédaient pas. Il est donc intéressant de noter que l'activité nitrite réductase est espèce dépendante chez les staphylocoques. Cette activité peut aussi être souche dépendante comme chez *S. xylosus*. La nitrite réductase chez *S. carnosus* est une enzyme cytosolique impliquée dans la régénération du NADH (Neubauer & Götz, 1996). Ces auteurs ont montré que l'activité nitrite réductase a lieu en condition anaérobie et est induite par la présence de nitrate et de nitrite *in vitro*.

2.2.2 L'opéron nir

Tout comme pour la nitrate réductase, la nitrite réductase a été particulièrement bien décrite chez *S. carnosus* (Neubauer *et al.*, 1999). Un seul type de nitrite réductase a été retrouvé dans cette espèce, elle montre également des similarités avec la nitrite réductase Nir de *E. coli* et les nitrites réductases Yrh et Nas de *B. subtilis* (Neubauer *et al.*, 1999).

Chez *S. carnosus*, l'organisation génétique de *sirA*, *nirB*, *nirD* et *sirB* suggère une transcription couplée et une structure en opéron (Figure 12). Cette opéron est appelé l'opéron nitrite réductase ou *nir*. Une région promotrice est retrouvée en amont de *sirA* (Neubauer *et al.*, 1999).

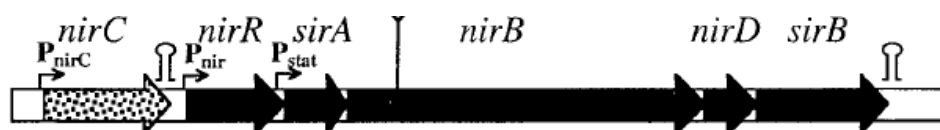


Figure 12: L'opéron *nir* chez *Staphylococcus carnosus* (Neubauer *et al.*, 1999)

Deux gènes en aval de *sirA* gènes codent respectivement pour les protéines NirB et NirD qui sont impliquées dans l'activité nitrite réductase (Neubauer *et al.*, 1999). Comme chez *E. coli*, les protéines NirB et NirD sont essentielles et suffisantes pour la réduction du nitrite de façon NADH dépendante (Neubauer *et al.*, 1999). Le gène *sirA* code une protéine similaire à la partie N terminal de la protéine CyG chez *E. coli*, alors que le gène *sirB* code, quant à lui, une protéine similaire à la partie C terminal de la protéine CyG chez *E. coli*. Les protéines SirA et SirB (ou CysG chez *E. coli*) sont essentielles à la biosynthèse du groupement prosthétique de type sirohème servant de cofacteur (Neubauer *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 1993). SirA catalyse la méthylation S-adenosyl-méthionine-dépendante de l'uroporphyrinogène III en dihydrosirohydrochlorine, SirB est important pour la déhydrogénation pyridine-dinucléotide-dépendante de la dihydrosirohydrochlorine en sirohydrochlorine.

Un autre gène est présent chez *S. carnosus* en amont de *sirA*, il s'agit de *nirR*. Le produit de ce gène, NirR, montre peu de similarités avec les séquences retrouvées chez *E. coli* et *B. subtilis*. Cette protéine pourrait avoir un rôle de régulateur ou être impliquée dans l'assemblage de complexe *nir* (Neubauer *et al.*, 1999).

En amont de *nirR*, le gène *nirC* codant une protéine membranaire a été identifié. Cette protéine montre des similarités avec la protéine NirC de *E. coli* cependant chez *S. carnosus* elle possède son propre promoteur et son propre terminateur et ne fait pas partie de l'opéron *nir* (Neubauer *et al.*, 1999). Un mutant de délétion du gène *nirC* chez *S. carnosus*, a révélé que NirC n'était pas responsable de l'import du nitrite à pH alcalin et n'influçait pas l'excrétion d'ammoniaque (Neubauer *et al.*, 1999). Le rôle de NirC reste à définir.

La réduction du nitrite est régulée à différentes étapes (Figure 13) (Neubauer *et al.*, 1999). Le premier niveau de régulation se situe au niveau de la transcription. L'oxygène, sous la dépendance de protéines régulatrices, inhibe la transcription de l'opéron *nir* alors que la présence de nitrite favorise cette transcription. La protéine NirR pourrait également jouer un rôle de régulateur dans l'expression de l'opéron *nir*, mais son rôle reste à définir comme nous l'avons mentionné précédemment. D'autres étapes comme la traduction, le repliement et l'assemblage des protéines et l'incorporation de groupes prosthétiques sont également sensibles à l'oxygène. De plus la nitrite réductase est active en anaérobiose et inactive en présence d'oxygène. Finalement plus d'investigations sont nécessaires pour comprendre la complexité du fonctionnement du système de la nitrite réductase.

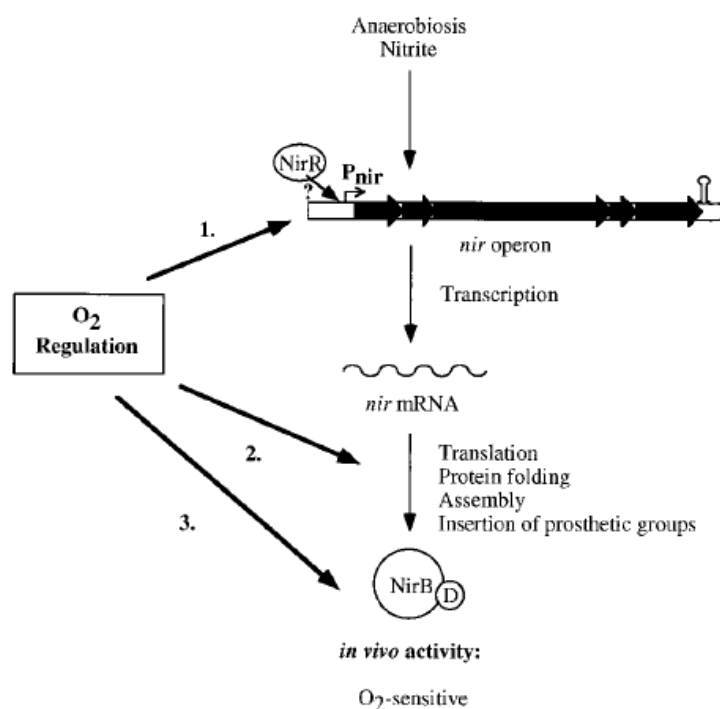


Figure 13: Modèle de l'expression et de la régulation de l'opéron *nir* chez *Staphylococcus carnosus* (Neubauer *et al.*, 1999)

2.3 Mécanismes de régulation des opérons *nar* et *nir*

Bien que les séquences en acides aminés de la nitrate et de la nitrite réductases de *S. carnosus* soient proches de celles de *E. coli*, les protéines régulatrices et les séquences opératrices sont différentes (Neubauer *et al.*, 1999; Pantel *et al.*, 1998). Chez *E. coli*, l'expression des opérons *nir*, *nar* et du gène *narT* sont sous la dépendance du facteur FNR (Fumarate et Nitrate réductase Régulateur) (Darwin & Stewart, 1996). Ce facteur contrôle la transcription des gènes en anaérobiose en agissant comme un senseur et un régulateur (Kiley & Beinert, 1998). Deux autres systèmes régulateurs à deux composants NarX-NarL et NarQ-NarP coordonnent les réponses transcriptionnelles aux nitrates et nitrites (Kiley & Beinert, 1998). Dans la région promotrice de l'opéron *nar* de *S. carnosus*, seul un site putatif d'accrochage à NarL a été identifié (Pantel *et al.*, 1998). Aucun homologue du facteur FNR n'a été identifié chez *S. carnosus* et *S. aureus* (Pantel *et al.*, 1998; Throup *et al.*, 2001).

Fedtke *et al* (2002) ont identifié, chez *S. carnosus*, trois gènes désignés *nreABC*, situés en aval de l'opéron *narGHIIJ* qui lient cet opéron avec le gène *narT* (Figure 14). Le mutant de délétion *nre* est sévèrement impacté dans sa capacité à réduire le nitrate et le nitrite en

aérobiose et anaérobiose du fait de la transcription réduite des opérons *nar*, *nir* et du gène *narT* (Fedtke *et al.*, 2002). Le système *nreABC* a également été étudié chez *S. aureus* (Figure 14). Les gènes *nreABC* de *S. aureus* partagent 50%, 57% et 85% d'identité avec ceux de *S. carnosus* (Schlag *et al.*, 2008). Une étude comparative entre les transcrits et les protéomes du mutant *nre* et la souche sauvage de *S. aureus* a permis de confirmer le rôle du système NreABC dans la régulation des opérons *nar* et *nir* en anaérobiose et en présence de nitrate (Schlag *et al.*, 2008). Ces résultats ont montré que la transcription des gènes des opérons *nar* et *nir* était diminuée et que l'accumulation des protéines correspondantes était diminuée dans le mutant *nre*.

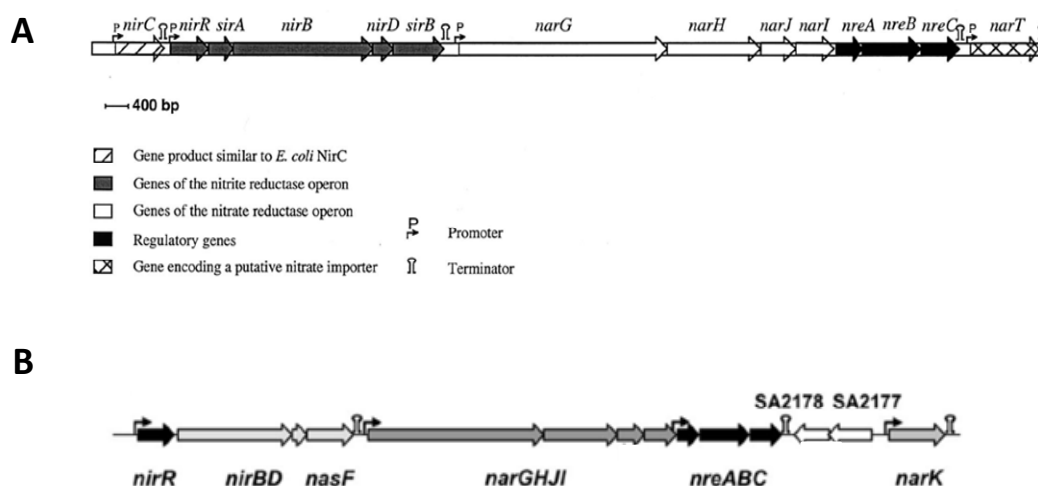


Figure 14: Carte génétique des gènes impliqués dans la réduction et la régulation des nitrate/nitrite chez (A) *S. carnosus* (Fedtke *et al.*, 2002) et (B) *S. aureus* (Schlag *et al.*, 2008)

Chez *S. carnosus* il a été montré que la protéine NreB est le principal senseur de l'oxygène. En absence d'oxygène, l'activité d'autophosphorylation de l'histidine kinase cytoplasmique NreB augmente, NreC est ensuite phosphorylée par NreB et s'accroche spécifiquement aux promoteurs des opérons *nar* et *nir* pour augmenter leur transcription (Fedtke *et al.*, 2002; Mullner *et al.*, 2008).

La fonction de la protéine NreA a été très récemment définie chez *S. aureus* (Nilkens *et al.*, 2014). NreA interagit physiquement et fonctionnellement avec NreB en réponse au nitrate. En effet en absence de nitrate NreA se fixe à NreB et inhibe l'activité de phosphorylation de NreB ce qui diminue aussi la phosphorylation de NreC et conduit à la diminution de la transcription des gènes des opérons *nar* et *nir* (Figure 15). A l'inverse en présence de nitrate,

un complexe NreA-nitrate se forme et empêche l'interaction avec NreB. NreB a une forte activité d'autophosphorylation, active NreC et conduit à une forte transcription des gènes *nar* et *nir* (Nilkens *et al.*, 2014).

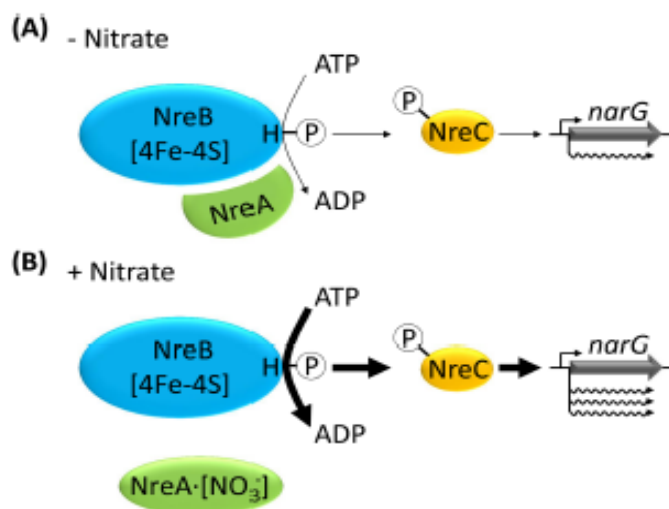


Figure 15: Modèle de la fonction de NreA dans la régulation de l'expression de *narG* chez *S. aureus* en condition anaérobie (A) en absence et (B) en présence de nitrate (Nilkens *et al.*, 2014)

3. PRODUITS CARNES FERMENTES SANS AJOUT DE NITRATE ET DE NITRITE

Les produits carnés fermentés comme le saucisson et les produits saumurés sont des produits de tradition préférentiellement fabriqués dans le monde occidental. Le nitrate et/ou le nitrite sont couramment utilisés comme additifs dans ces produits, ils contribuent à leurs propriétés sensorielles et à la préservation de la sécurité microbiologique des produits. Les nitrates et les nitrites sont aujourd'hui considérés comme indésirables dans l'alimentation pour des raisons de toxicité pourtant, comme nous allons le voir, des études récentes argumentent en faveur de leur risque limité.

Le risque majeur de la présence des nitrates/nitrites dans l'alimentation est relié au potentiel du nitrite à former des composés nitrosés carcinogènes aussi bien dans les produits alimentaires que dans le corps humain (Hammes, 2011). Comme Honikel (2008) le souligne, la probabilité de former des N-nitrosamines stables dans la viande est assez faible au vu des

concentrations retrouvées dans la viande saumurée. Ces composés peuvent toutefois être produits quand les produits sont exposés à des températures excédant 130°C.

Pour prévenir les risques potentiels des nitrates et nitrites, des saucissons fermentés de façon industrielle sans ces additifs ont été préparés. Hammes (2011) a montré que l'omission de ces additifs sans connaissances technologiques suffisantes et modifications conséquentes des procédés conduisait à une faible qualité sensorielle et microbiologique avec notamment la persistance d'entérobactéries à la fin du process de fabrication (Hammes, 2011).

Pour éviter d'ajouter directement des nitrates et garder les propriétés sensorielles et microbiologiques des produits fermentés, d'autres ingrédients ont été testés, contenant de façon naturelle des nitrates. Comme rapporté par Sebranek & Bacus (2007), des épices ou du jus de céleri peuvent être une alternative. Ces auteurs mentionnent que la concentration en nitrate d'une poudre provenant d'un jus de céleri concentré était élevée contrairement à d'autres ingrédients naturels comme le sel de mer ou le sucre brut qui contiennent des concentrations en nitrate trop faible pour être utilisable de façon pratique en industrie (Sebranek & Bacus, 2007). Les produits finaux obtenus par ces nouvelles pratiques sont catégorisés sous le terme «clean label food». Ainsi le nitrate ajouté de façon « naturel » doit être réduit en nitrite sous l'action des ferments.

Les études de cohortes humaine et animale montrent que le nitrate alimentaire pourrait contribuer à l'effet bénéfique exercé par le monoxyde d'azote (NO) synthétisé de façon endogène à partir d'arginine sous l'action des oxydes nitriques synthases (Gladwin *et al.*, 2005). Lundberg (2008, 2009, 2011) a listé les effets bénéfiques d'un apport modéré en nitrate sur la santé humaine : la diminution de la tension artérielle, l'inhibition de la fonction plaquettaire, la prévention de la dysfonction endothéliale après un accident ischémique mineur chez l'homme, la réduction du coût en oxygène pendant un exercice physique et l'amélioration des fonctions mitochondriales. D'autres données chez les animaux ont montré que le nitrate pouvait diminuer la pression artérielle de façon prolongée, protéger contre les drogues et le sel causant des problèmes cardiaques et rénaux et améliorer le flux sanguin ischémique (Aisen *et al.*, 1978; Lundberg *et al.*, 2008; Lundberg *et al.*, 2009; Lundberg *et al.*, 2011). Le nitrite aurait un rôle de défense dans l'estomac, les muqueuses, la cavité buccale (contre les bactéries cariogènes), sur la peau (via la sueur en ayant une action contre les agents pathogènes) et dans le tractus urinaire (Lundberg *et al.*, 2004). L'ensemble de ces effets positifs des nitrates et nitrites dans l'alimentation remet en question la toxicité potentielle de ces composés (Lundberg *et al.*, 2004).

Les concentrations en nitrates et nitrites dans les produits carnés sont généralement faibles comparées à celles retrouvées dans les sources végétales (Honikel, 2008). Le céleri, les radis ou les épinards peuvent apporter plus de nitrate par portion que les produits carnés (une salade d'épinard de 125 g apporte 881 mg de nitrate) (Oostindjer *et al.*, 2014). Le risque du nitrite présent dans les produits carnés est relativement faible comparé au risque provenant du nitrite formé de façon endogène à partir d'une ingestion de végétaux (Oostindjer *et al.*, 2014).

-CHAPITRE 4-

Acquisition, régulation et homéostasie du fer chez les staphylocoques

Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants. Le fer (Fe), peut adopter une des deux formes redox : la forme réduite ferreuse (Fe^{2+}) ou la forme oxydée ferrique (Fe^{3+}). Son potentiel d'oxydo-réduction peut varier en fonction des molécules auxquelles il est lié. Ces propriétés font du fer un cofacteur majeur pour de nombreuses enzymes impliquées dans des processus cellulaires indispensables pour la vie tels que la respiration, la réplication de l'ADN, la synthèse d'acides aminés et le transport d'électrons (Andrews *et al.*, 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004). Le fer est l'un des éléments les plus abondants sur terre, malgré cela, il n'est pratiquement pas disponible à l'état soluble (c'est-à-dire sous sa forme réduite) dans la plupart des environnements. Chez les organismes vivants, le fer est généralement complexé à des protéines telles que la transferrine, la lactoferrine et la ferritine par une liaison directe avec les acides aminés, ou bien indirecte par l'intermédiaire de l'hème, dans les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine). Face à la faible disponibilité du fer, la plupart des bactéries mettent en place différents mécanismes visant à acquérir du fer, afin de pouvoir coloniser l'environnement dans lequel elles se trouvent. De plus, le fer réduit en présence de l'oxygène est extrêmement toxique comme il intervient dans la réaction de Fenton, conduisant à la réduction partielle de l'oxygène et à la libération des radicaux hydroxyles qui endommagent les cellules (Touati, 2000). L'homéostasie du fer doit ainsi être strictement régulée.

1. ACQUISITION DU FER

1.1 Généralités

Pour contourner la difficulté d'acquérir du fer dans les différentes niches écologiques, les staphylocoques ont développé plusieurs mécanismes leur permettant d'acquérir du fer. Ces mécanismes ont été particulièrement étudiés chez les bactéries pathogènes et notamment chez *S. aureus*. Cette bactérie est devenue un modèle concernant l'acquisition et le transport du fer chez les bactéries à Gram positif. L'acquisition de fer, et en particulier de l'hème présent chez

l'hôte, est en effet requise pour la colonisation et donc la pathogénèse de *S. aureus* (Hammer & Skaar, 2011).

Les staphylocoques peuvent acquérir du fer de l'hème et récupérer du fer inorganique de façon directe (Beasley & Heinrichs, 2010; Haley & Skaar, 2012; Hammer & Skaar, 2011). Ils peuvent aussi élaborer plusieurs types de sidérophores et acquérir du fer de façon indirecte. Les sidérophores, sont des molécules de faible poids moléculaires (< 1000 Da), qui lient le fer ferrique (Fe^{3+}) avec une très forte affinité permettant sa solubilisation et son extraction du milieu inorganique ou à partir des protéines (transferrine, lactoferrine, ferritine). Le transport des sidérophores dans le cytoplasme se fait grâce à des transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette). Plus de 500 sidérophores différents produits par des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif sont caractérisés.

Il a été montré que chacun de ces systèmes utilise une protéine de membrane régulatrice spécifique du fer, très souvent une cassette d'accrochage ATP dépendant, pour acquérir du fer complexé ou non (Davidson *et al.*, 2008). En plus de cet ABC transporteur et d'une ATPase, ces systèmes ont besoin d'une lipoprotéine de haute affinité pour le fer (Sheldon & Heinrichs, 2012).

1.2 L'acquisition directe

L'acquisition directe est basée sur un contact entre les protéines de surface bactérienne et les sources de fer liées ou non à l'hème. Chez *S. aureus*, plusieurs systèmes ont été décrits comme mécanisme d'acquisition directe du fer. Il s'agit des systèmes Isd, Fep, Opp et Sit.

1.2.1 Le système Isd

Le système Isd (Iron regulated surface determinant) représente la voie prédominante pour acquérir du fer de l'hème chez *S. aureus* (Mazmanian *et al.*, 2003). Skaar *et al* (2004) ont montré que le fer provenant de l'hème est la source préférentielle de fer durant une infection à *S. aureus*.

Chez *S. aureus*, le système Isd est codé par cinq loci : *isdA*, *isdB*, *isdCDEFsrtBisdG*, *isdH* et *orfXisdI* (Skaar & Schneewind, 2004) (Figure 16). IsdA, IsdB et IsdH contiennent un motif LPXTG et sont accrochées au peptidoglycane par l'activité de la sortase A, codée par le gène *srtA* non colocalisé avec le système Isd. IsdC possède un motif NPQTN et est accrochée au

peptidoglycane par l'activité de la sortase B, codée par le gène *srtB*. Les sortases jouent le rôle de transpeptidase et clivent les protéines au niveau de leur motif d'ancrage puis les transfèrent sur le peptidoglycane (Marraffini *et al.*, 2006). IsdDEF est un transporteur membranaire de type ABC ayant un rôle de transport de l'hème à travers la membrane plasmique (Skaar & Schneewind, 2004). Le modèle actuel proposé concernant l'import d'hème par le système Isd est le suivant (Figure 16) : IsdA, IsdB et IsdH sont des hémoprotéines servant de récepteur à la surface des bactéries, ces trois protéines transfèrent l'hème à IsdC qui le transporte à travers le peptidoglycane jusqu'au système de transport membranaire de type ABC ou interviennent les protéines IsdDEF (Mazmanian *et al.*, 2003). La lipoprotéine IsdE reçoit ainsi l'hème transporté par IsdC et IsdE transfère l'hème à la perméase IsdF qui le transporte à travers la membrane de façon énergie dépendante grâce à IsdD (Mazmanian *et al.*, 2003). Le transfert de l'hème est rendu possible par la présence d'un domaine NEAT (NEAr iron transporter) présent chez IsdA, IsdB, IsdH et IsdC (Grigg *et al.*, 2007). Les domaines NEAT sont formés de 125 acides aminés essentiels pour l'interaction avec les sources de fer dont principalement l'hème (Grigg *et al.*, 2007). Pour utiliser l'hème comme source de fer, *S. aureus* possède deux protéines cytoplasmiques dégradant l'hème: IsdG et IsdI (Skaar *et al.*, 2004a). Ces deux protéines partagent 64% d'identité concernant leur séquence en acides aminés (Wu *et al.*, 2005). Le gène *isdG* est cotranscrit avec l'opéron *isdCDEFsrtBisdG*. La dégradation de l'hème par IsdG et IsdI conduit à la libération de fer et à la formation de différentes molécules composées d'isomère β et σ de bilirubine appelées staphylobiline (Reniere *et al.*, 2010).

L'analyse de génomes a révélé que d'autres bactéries pathogènes à Gram positif comme *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Listeria monocytogenes* et *Clostridium tetani* possédaient le système Isd (Hammer & Skaar, 2011). Chez *B. anthracis* un opéron de 8 gènes a été décrit (*isdCJKEFXsrtBisdG*), les protéines IsdJ et IsdK, non présentes chez *S. aureus*, auraient un rôle spécifique de reconnaissance de l'hémoglobine (Gat *et al.*, 2008). Ce système a aussi été caractérisé chez un autre staphylocoque pathogène, *Staphylococcus lugdunensis*. Il s'agit du seul staphylocoque à coagulase négative possédant ce système à ce jour (Zapotoczna *et al.*, 2012). Le système décrit chez *S. lugdunensis* est similaire à celui de *S. aureus* hormis le fait que *S. lugdunensis* possède une seule protéine d'accrochage de l'hème (IsdB) et une seule hème oxygénase (IsdG), cette bactérie possède également deux autres protéines IsdJ et IsdK dont le rôle exact reste à définir mais qui pourraient seconder IsdB pour capter l'hème (Zapotoczna *et al.*, 2012).

N1/N2/N3 : domaines NEAT

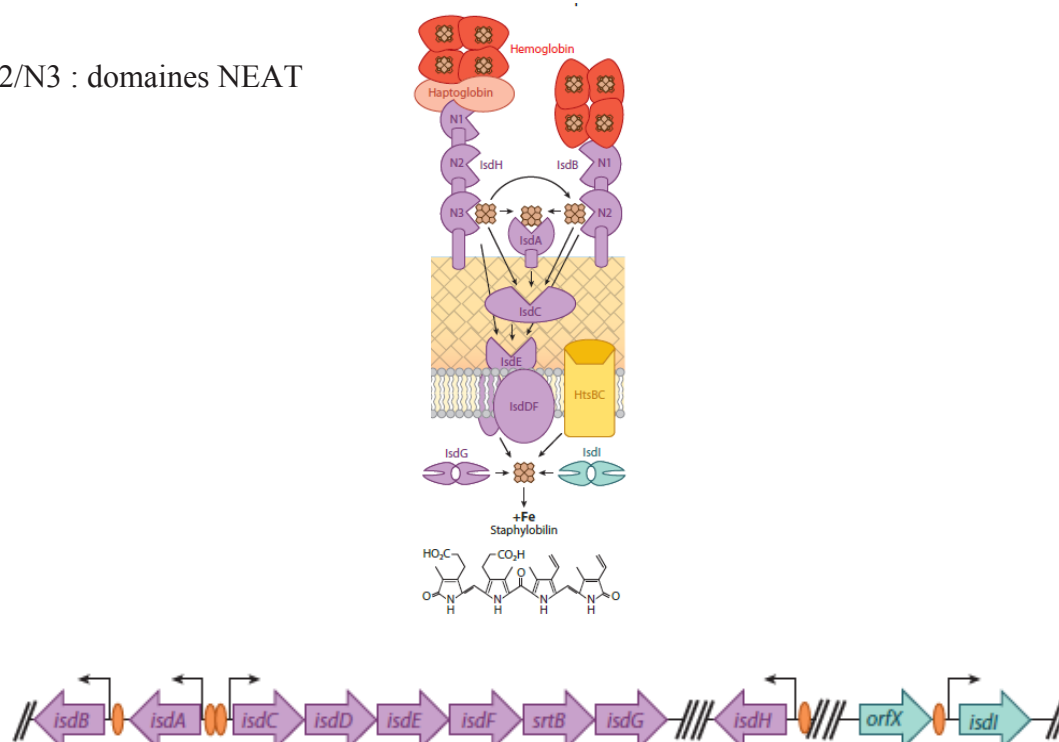


Figure 16: Acquisition du fer de l'hème chez *S. aureus* (Hammer & Skaar, 2011)

1.2.2 Le système Fep

Chez *S. aureus*, *S. carnosus* et *S. haemolyticus* l'opéron *fepABC* est associé à l'opéron *tatAC* (Biswas et al., 2009). FepA code une lipoprotéine membranaire pouvant accrocher du fer, FepB est une peroxidase dépendant du fer et FepC est une perméase ayant une haute spécificité pour le fer (Figure 17) (Biswas *et al.*, 2009; Sheldon & Heinrichs, 2012). Chez les staphylocoques la voie Tat est composée de TatA et TatC. La voie de translocation Tat (twin arginine translocation) est un bon moyen pour les lipoprotéines de traverser la membrane chez beaucoup de bactéries Gram positives (Thompson *et al.*, 2010). Elle a récemment été identifiée dans quelques génomes de staphylocoques comme *S. aureus*, *S. haemolyticus* et *S. carnosus* mais n'a pas été retrouvée chez *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* (Biswas *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2007). Chez *S. aureus* et *S. carnosus* les doubles mutants *tatAC* perdent la capacité d'exporter une protéine FepB active indiquant que cette protéine est un substrat de TatAC. Biswas et al (2009) ont ainsi démontré que la voie Tat est fonctionnelle chez ces deux espèces et qu'elle sert à transloquer la peroxidase FepB dépendant du fer.

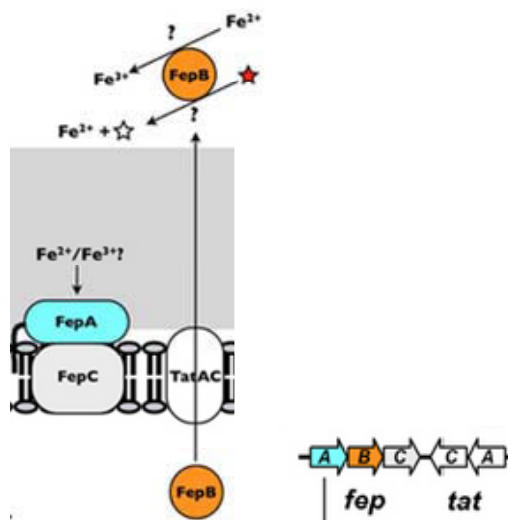


Figure 17: Le système Fep
(Sheldon & Heinrichs, 2012)

1.2.3 Le système opp

Les systèmes de transporteurs Opp (Oligopeptides internalized by oligopeptide permease) jouent un rôle clé chez de nombreuses bactéries pour l'acquisition de nutriments, la signalisation et l'adaptation à l'hôte.

Cinq opérons *opp* ont été décrits chez *S. aureus* (Hiron *et al.*, 2007). Parmi eux, l'opéron *opp1A1BC1DF* pourrait permettre d'acquérir du fer sous forme Fe^{2+} . Opp1A est la lipoprotéine du complexe, Opp1BC joue le rôle de perméase et Opp1DF est une ATPase liée à Opp1BC (Hempel *et al.*, 2011; Sheldon & Heinrichs, 2012). Une étude a montré que la protéine Opp1A était surexprimée en carence de fer (Figure 18) (Hempel *et al.*, 2011; Sheldon & Heinrichs, 2012). Chez *S. aureus* les autres systèmes pourraient avoir d'autres rôles : les systèmes Opp2 et Opp5, récemment renommés NikB et NikA, joueraient un rôle dans l'acquisition du nickel, le système Opp3 interviendrait dans le métabolisme des acides aminés et le rôle du système Opp4 n'est toujours pas caractérisé (Hiron *et al.*, 2007).

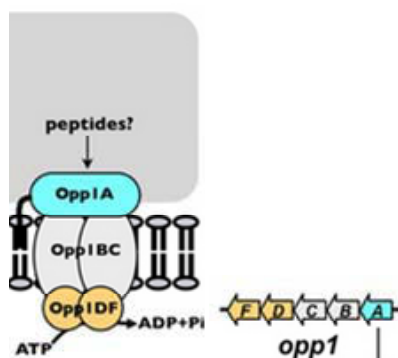


Figure 18: Le système Opp1
(Sheldon & Heinrichs, 2012)

1.2.4 Le système Sit/Mnt

La première étude visant à caractériser le système Sit chez les staphylocoques a été réalisée par Cockayne *et al* (1998). Chez *S. epidermidis* l'opéron *sitABC* code une protéine SitA qui est une ATPase, SitB qui est la perméase du système et SitC qui est la lipoprotéine (Figure 19) (Cockayne *et al.*, 1998; Sheldon & Heinrichs, 2012). Cockayne *et al* (1998) ont montré que la porosité relative du peptidoglycane rendrait SitC accessible aux cations métalliques (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) et aux antibiotiques. Si cette étude accorde plutôt un rôle du système Sit dans l'acquisition du fer chez *S. epidermidis*, Horsburg *et al* (2002) ont montré chez *S. aureus* que ce système était spécifique du manganèse. Les gènes *sitABC* ont donc été renommés *mntABC* chez *S. aureus* reflétant mieux leur activité et étant en accord avec la nomenclature établie chez *B. subtilis* (Horsburgh *et al.*, 2002; Que & Helmann, 2000). Le rôle de ce système dans le transport du fer reste encore à élucider.

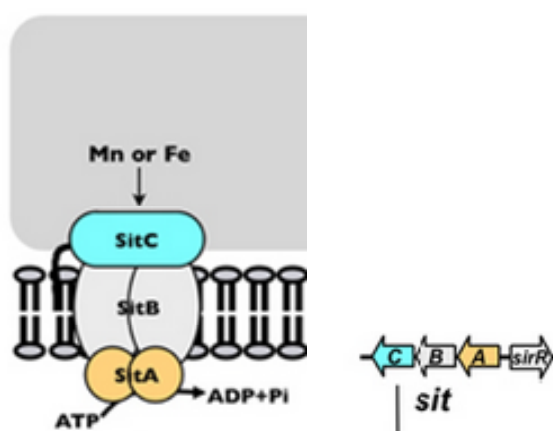


Figure 19: Le système Sit
(Sheldon & Heinrichs, 2012)

1.3 L'acquisition indirecte

Les staphylocoques peuvent sécréter des sidérophores ou utiliser des sidérophores exogènes, c'est-à-dire produits par d'autres micro-organismes afin d'acquérir du Fe^{3+} complexé ou non à des protéines. L'incorporation du complexe Fe^{3+} -sidérophore implique des protéines réceptrices et des transporteurs membranaires de type ABC. Deux sidérophores de type carboxylate, la staphyloferrine A (SA) et la staphyloferrine B (SB) ont été particulièrement décrites.

1.3.1 La staphyloferrine A

La staphyloferrine A (SA) a été purifiée pour la première fois d'un surnageant de culture de *S. hyicus* (Konetschny-Rapp *et al.*, 1990). La SA est une molécule hydrophile de 480 kDa comprenant deux molécules de citrate reliées par un pont D-ornithine. Sa production en milieu de culture carencé en fer est stimulée par une supplémentation d'ornithine (Meiwes *et al.*, 1990). Chez *S. aureus*, le système Sfa synthétise la SA alors que le système Hts capte le complexe SA-fer.

Chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* et *S. haemolyticus* quatre gènes interviennent dans la synthèse de ce sidérophore (Beasley & Heinrichs, 2010). Les gènes *sfaABC* forment un opéron tandis que *sfaD* est transcrit indépendamment (Figure 20). Le gène *sfaA* code la perméase du système SfaA, les autres protéines SfaBCD interviennent dans la synthèse de la SA (Beasley *et al.*, 2009; Beasley & Heinrichs, 2010). Les gènes *sfaABCD* sont présents dans les génomes de nombreux staphylocoques comme *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. pseudintermedius*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. carnosus* et *S. xylosus* (Sheldon & Heinrichs, 2012).

L'opéron *htsABC* est adjacent au cluster *sfaABC* chez *S. aureus* et chez les staphylocoques à coagulase négative (Figure 20) (Beasley *et al.*, 2009). Le transporteur Hts est spécifiquement reconnu par la SA et joue ainsi le rôle de récepteur. Il a été montré chez *S. aureus* qu'un mutant *htsABC* perdait la capacité de fixer la SA (Beasley *et al.*, 2009). De façon surprenante, malgré le coup énergétique d'un transport de sidérophores, l'opéron *hts* ne code pour aucune ATPase, laissant suggérer que l'ATPase PhuC pourrait jouer ce rôle dans le transport de la SA (Beasley *et al.*, 2009). Une autre étude a par ailleurs décrit le rôle du système Hts dans l'acquisition de l'hème en montrant que l'inactivation des protéines HtsB et HtsC détournait

S. aureus de l'acquisition de l'hème, sa source préférentielle de fer, vers la transferrine (Skaar *et al.*, 2004b).

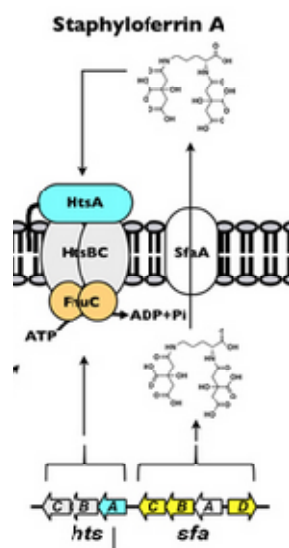


Figure 20: La staphyloferrine A chez *S. aureus* (Sheldon & Heinrichs, 2012)

1.3.2 La staphyloferrine B

La staphyloferrine B est une protéine hydrophile de 448 kDa composée d'acide diaminopropionique, de citrate, d'éthylène diamine et de cétooglutarate (Drechsel *et al.*, 1993). La purification de cette protéine a été réalisée à partir d'un surnageant de culture de *S. hyicus* (Haag *et al.*, 1994). Une analyse HPLC a permis d'identifier ce sidérophore chez *S. aureus* (Drechsel *et al.*, 1993, Haag *et al.*, 1994). Sur le même principe que la SA, la SB est d'abord biosynthétisée par le système Sbn puis captée par le système Sir.

Chez *S. aureus*, un opéron de 9 gènes désigné *sbnABCDEFGHI* est impliqué dans la synthèse de la SB (Figure 21) (Dale *et al.*, 2004). Si le rôle de SbnCEF a été bien caractérisé dans la synthèse de la SB (Dale *et al.*, 2004), le rôle des autres protéines de cet opéron reste toutefois à définir. Bien qu'il ait été reporté que la SB pouvait être produit par certaines espèces à coagulase négative, aucun cluster de gène *sbn* n'a été identifié dans les génomes séquencés et disponibles (Dale *et al.*, 2004, Beasley & Heinrichs, 2010).

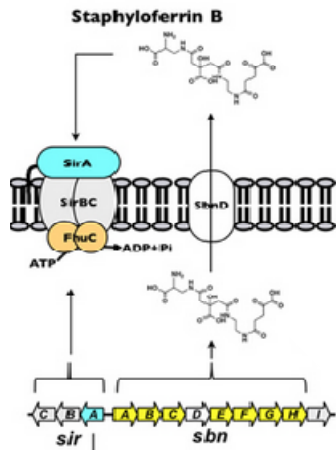


Figure 21: La staphyloferrine B chez *S. aureus*
(Sheldon & Heinrichs, 2012)

Le système Sir reconnaît de façon spécifique la SB. L'opéron *sirABC* (staphylococcal iron regulated) est transcrit de façon indépendante de l'opéron *sbm* chez *S. aureus*. Chez cette bactérie, la reconnaissance de la SB complexée au fer est sous la dépendance du récepteur SirA et de la perméase SirBC, ce transport est énergie dépendant (Dale *et al.*, 2004; Morrissey *et al.*, 2000). L'ATPase FhuC pourrait jouer un rôle dans le transport de la SB (Beasley *et al.*, 2009) (Figure 21). Comme *sbm*, *sirABC* n'a pas été identifié dans les génomes des staphylocoques à coagulase négative disponibles (Beasley & Heinrichs, 2010).

1.3.3 Le transport de sidérophores exogènes

Deux autres systèmes ont été décrits chez *S. aureus* et pourraient avoir un rôle dans le transport de sidérophores exogènes (Beasley & Heinrichs, 2010).

Les staphylocoques ne sont pas reconnus pour synthétiser des sidérophores de type hydroxamate mais ils sont toutefois capables de les utiliser comme source de fer (Beasley & Heinrichs, 2010). Ces sidérophores sont l'aérobactine (produite par les entérobactéries), les ferrichromes (produits par *Basidiomycete fungus*), le coprogen (produit par *Neurospora crassa*) et la desferrioxamine B (produit par *Streptomyces pilosus*) (Sebulsky *et al.*, 2000; Sebulsky & Heinrichs, 2001).

Le système FhuCBG-D1-D2 est requis pour l'acquisition de sidérophores de type hydroxamate (Figure 22). Ce transporteur comprend un système de perméase FhuBG, une ATPase FhuC et un duo de récepteur FhuD1 et FhuD2 (Hammer & Skaar, 2011). Ces

protéines responsables de l'acquisition des sidérophores de type hydroxamate ont été également bien caractérisées chez *E. coli* et *B. subtilis* (Burkhardt & Braun, 1987; Schneider & Hantke, 1993). L'opéron *fhuCBG* et les gènes *fhuD1* et *fhuD2* sont localisés à des endroits très différents sur le chromosome de *S. aureus*. A l'exception de *S. hominis*, tous les autres staphylocoques possèderaient le système Fhu (Sebulsky *et al.*, 2000, Sheldon & Heinrichs, 2012).

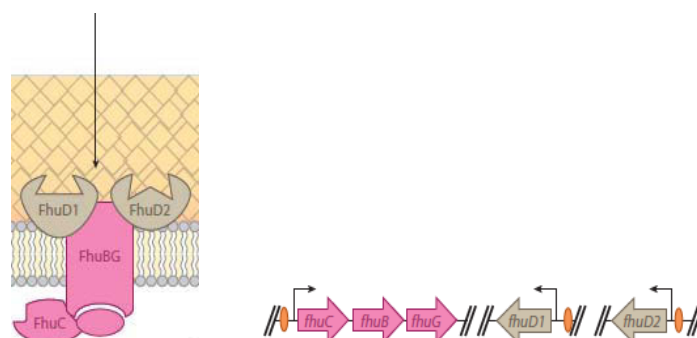


Figure 22: Le système Fhu chez *S. aureus*
(Hammer & Skaar, 2011)

Les sidérophores de type catécholate bien étudiés sont l'entérobactine (produite par les entérobactéries) et la vibriobactine (*Vibrio cholerae*) (Miethke & Marahiel, 2007). Les hormones de stress de type catécholamine peuvent aussi stimuler la croissance des bactéries dans le sérum, incluant certaines espèces de staphylocoques à coagulase négative (Neal *et al.*, 2001). Beasley *et al* (2011) ont montré que le locus *sstABC* était indispensable à la croissance de *S. aureus* en présence de catéchols et de transferrine comme unique source de fer. Le locus *sstABC* est très conservé et se retrouve chez la majorité des staphylocoques à coagulase négative (Morrissey *et al.*, 2000). Les protéines SstAB servent de perméase, SstC joue le rôle d'ATPase et SstD est la lipoprotéine du système (Figure 23) (Beasley *et al.*, 2011; Sheldon & Heinrichs, 2012). SstD capte à la fois à des sidérophores de type catéchol et des hormones de stress de type catécholamine. La lipoprotéine SstD reconnaît un spectre de substrats plus large que les lipoprotéines HtsA et SirA.

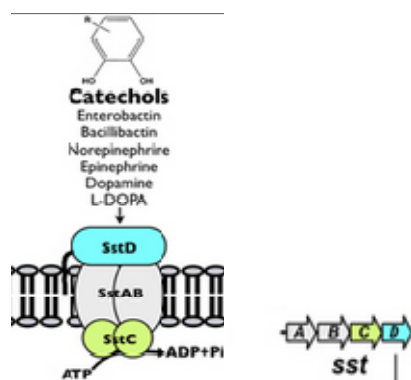


Figure 23: Le système Sst chez *S. aureus*
(Sheldon & Heinrichs, 2012)

2. REGULATION ET HOMEOSTASIE DU FER

Le fer est un élément essentiel pour la croissance et le développement des bactéries. Paradoxalement, il peut aussi être toxique à l'état ferreux par sa faculté à exacerber le stress oxydant. Il y a donc nécessité pour la bactérie de réguler finement ses concentrations cellulaires en fer. Il s'agit de maintenir une concentration intracellulaire en fer suffisante pour répondre aux besoins cellulaires et non excessive pour éviter son effet toxique.

2.1 Régulation

2.1.1 Le régulateur Fur

Chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif à faible pourcentage en GC dont les staphylocoques, la régulation du métabolisme du fer est réalisée par l'intermédiaire du régulateur transcriptionnel Fur (Ferric uptake regulator) qui présente une activité dépendante du fer. Fur fut initialement décrit comme un régulateur transcriptionnel qui agit en réprimant l'expression des gènes (Escolar *et al.*, 1999). C'est une protéine de faible poids moléculaire, d'environ 17 kDa, capable de former des dimères. Chaque sous-unité de Fur est composée de deux domaines: le domaine N-terminal contenant le motif hélice-tour-hélice lui permettant de se fixer à l'ADN et le domaine C-terminal contenant généralement un motif riche en histidine important pour la dimérisation de la protéine et responsable de l'interaction avec le fer (Stojiljkovic & Hantke, 1995). Dans un environnement riche en fer, Fur lie l'ion ferreux au niveau C-terminal et acquiert une conformation qui augmente fortement son affinité pour sa

cible d'ADN. La liaison de Fur à l'ADN inhibe la transcription des gènes qui sont sous la dépendance de ce facteur.

Lorsque le milieu est carencé en fer, la liaison Fur-fer se dissocie et Fur se détache de l'ADN permettant à l'ARN polymérase d'accéder aux promoteurs. Les gènes sous le contrôle de Fur seront ainsi transcrits. Le complexe Fur-fer se fixe sur l'ADN au niveau d'une séquence consensus appelée Fur Box, située au niveau des régions -35 et -10 des promoteurs (Escobar *et al.*, 1999). A l'origine, les études faites chez *E. coli* ont mis en évidence une séquence palindromique de 19 pb à répétition inversée. Escobar *et al.* (1999) ont ainsi montré qu'il s'agissait d'un motif constitué de trois hexamères capables d'interagir avec Fur dont deux identiques GATAAT et le troisième CTATTA à répétition inversée. Des réinterprétations faites chez *Bacillus subtilis* ont suggéré que la boîte Fur est constituée de 21 pb, formant deux heptamères à répétitions inversées chevauchants dont chacun lie le dimère Fur de part et d'autre de la double hélice et permet par conséquent l'enroulement de Fur autour de l'ADN (Baichoo *et al.*, 2002).

Chez les staphylocoques, la première mise en évidence d'une Fur box a été réalisée chez *S. aureus*. Cette étude a montré qu'en amont de *sirA* se trouvait une séquence de 19pb montrant des similarités avec les Fur boxes rencontrées chez les bactéries gram négatives (Heinrichs *et al.*, 1999). Depuis de nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser l'influence de Fur chez les staphylocoques. Il régule l'expression des gènes codant des protéines intervenant dans les systèmes d'acquisition du fer (Sheldon & Heinrichs, 2012). Une Fur Box est retrouvée en amont de chacun des opérons précédemment décrit : *Isd*, *Opp*, *Sfa-Hts*, *Sbn-Sir*, *Fhu* (Beasley *et al.*, 2009; Beasley & Heinrichs, 2010; Dale *et al.*, 2004; Hempel *et al.*, 2011; Reniere & Skaar, 2008). Fur intervient aussi l'expression d'un large nombre de protéines cytoplasmiques, dans la formation de biofilms et dans l'expression de protéines antioxydantes (Friedman *et al.*, 2006; Horsburgh *et al.*, 2001b; Johnson *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2006).

2.1.2 Le régulateur SirR

SirR a été initialement découvert chez *S. epidermidis* (Cockayne *et al.*, 1998). Comme pour Fur, la transcription des gènes sous le contrôle de SirR est bloquée en présence de cations divalents car les ions métalliques favorisent l'accrochage de SirR sur les SirR boxes (Ando *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 1998). Cette répression s'arrête lorsque la concentration en ions métalliques diminue. La transcription de *sitABC* est ainsi réprimée par SirR en présence de

Mn²⁺ et/ou de Fe²⁺ chez *S. epidermidis* (Hill *et al.*, 1998). La protéine homologue chez *S. aureus* a été nommée MntR (Ando *et al.*, 2003; Horsburgh *et al.*, 2002).

2.1.3 Senseurs et systèmes d'efflux de l'hème

La source la plus abondante de fer chez les vertébrés est l'hème, comme nous l'avons vu *S. aureus* a acquis des systèmes spécifiques afin d'utiliser cette source de fer. Paradoxalement l'hème est toxique à forte concentration et doit donc être finement régulé (Anzaldi & Skaar, 2010).

S. aureus est capable de survivre en présence de fortes concentrations d'hème. Cette adaptation est due à l'implication du système à deux composants HssR/HssS (Heme Sensing System) dans la régulation de l'opéron *hrtAB* codant le système d'efflux d'hème HrtAB (Heme Regulated Transport system) (Figure 24) (Friedman *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006). Le système HssR/HssS est constitué d'une protéine senseur histidine kinase HssS et d'un régulateur HssR. Lorsque la protéine senseur HssS perçoit l'hème, elle phosphoryle le régulateur HssR qui va se fixer à une séquence inversée répétée en amont du gène *hrtA* activant alors sa transcription (Stauff *et al.*, 2007). La protéine HrtA est nécessaire à la protection contre les effets toxiques de l'hème. La protéine HrtB a un rôle de perméase (Friedman *et al.*, 2006). Chez *S. aureus*, l'inactivation des gènes *hrtA* et *hrtB* lorsque l'hème est la seule source de fer conduit à un fort déficit de croissance (Friedman *et al.*, 2006). Le système HrtAB permet ainsi l'efflux de l'excédant d'hème intracellulaire, préservant ainsi la cellule des effets toxiques de la molécule et assurant ainsi l'homéostasie de l'hème (Torres *et al.*, 2006). Des systèmes à deux composants ont été retrouvés chez *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *L. monocytogenes* et *E. faecalis*, ce qui en fait un système propre aux bactéries à Gram positif (Torres *et al.*, 2006).

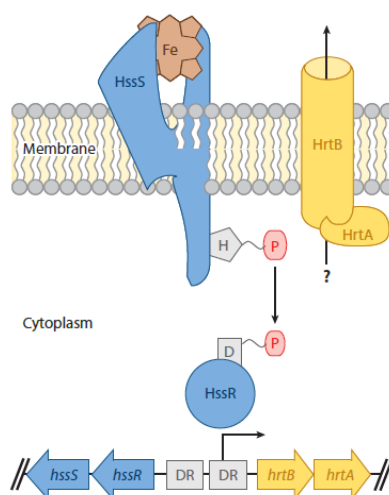


Figure 24: Le système Hrt/Hss chez *S. aureus* (Hammer & Skaar, 2011)

2.2 Séquestration du fer

Les bactéries peuvent constituer des réserves en fer au sein d'une classe particulière de protéines nommées ferritines. Les ferritines constituent une large famille de protéines de stockage du fer répandue dans les 3 règnes du vivant. Chez les bactéries, il existe trois types de protéines de stockage du fer, *i*) les ferritines trouvées chez les procaryotes mais également chez les eucaryotes, *ii*) les bactérioferritines uniquement présentes chez les bactéries capables de fixer l'hème (Andrews, 1998; Carrondo, 2003) et *iii*) les ferritines dodécamériques de type Dps (Dna-binding Protein from Starved cells) présentes uniquement chez les procaryotes (Smith, 2004). Ces différentes ferritines forment des familles distinctes du point de vue évolutif, néanmoins elles sont relativement proches quant à leur structure. Plusieurs ferritines ont été cristallisées et toutes possèdent une architecture similaire. Il s'agit de protéines multimériques composées de 24 sous-unités identiques (pour les ferritines et les bactérioferritines) ou 12 (pour les protéines Dps) qui s'assemblent pour former une coque protéique sphérique entourant une cavité centrale qui sert de réservoir de stockage du fer à l'état ferrique. La bactérioferritine possède également 12 hèmes de type b, soit un hème localisé entre deux sous unités et lié par deux résidus méthionine (Frolow *et al.*, 1994). Ces protéines sont localisées dans le cytoplasme des bactéries et permettent de stocker le fer lorsque qu'il est abondant dans l'environnement. Ces réserves seront mobilisées lorsque les bactéries sont dans un environnement carencé en fer.

Chez les staphylocoques, et de façon plus générale chez les firmicutes, peu d'études se sont intéressées aux ferritines. Chez *S. aureus* deux ferritines ont été caractérisées, il s'agit de FtnA et de MgrA (Morrissey *et al.*, 2004).

En réalisant des analyses *in silico*, un gène *ftnA* chez *S. aureus* et un gène *sefA* chez *S. epidermidis* ont été identifiés. Ils codent chacun un peptide de 19.5 kDa très conservé entre les deux espèces (Morrissey *et al.*, 2004). Ces deux polypeptides ont une composition en acides aminés caractéristique de la ferritine H des eucaryotes. Ceci laisse à supposer que *ftnA* et *sefA* codent chacun des ferritines (Morrissey *et al.*, 2004). Il a par ailleurs été montré que *ftnA* faisait partie du regulon PerR. Sa transcription est réprimée par PerR et est induite par des concentrations élevées en fer (Horsburgh *et al.*, 2001a). La transcription de *sefA* est également induite par des concentrations élevées en fer (Morrissey *et al.*, 2004).

MrgA, un homologue de la ferritine Dps décrite chez *E. coli*, a été identifié chez *S. aureus* (Morrissey *et al.*, 2004). Cette ferritine possède une fonction chélatrice du fer et une fonction de protection de l'ADN contre le stress oxydant (Morrissey *et al.*, 2004). En effet, il a été montré que la transcription de *mrgA* était induite par l'H₂O₂ et par le fer laissant suggérer que les facteurs PerR et Fur réguleraient la transcription de *mrgA* (Horsburgh *et al.*, 2001a; Morikawa *et al.*, 2006; Morrissey *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2008).

3. LE FER DANS L'ENVIRONNEMENT CARNE

3.1 Généralités

La viande est un aliment riche en fer (Mumvihill, 2014). Il existe deux types de sources de fer dans la viande : les sources hémiques et non hémiques.

La littérature ne permet pas aisément d'avoir une idée des concentrations en fer et du rapport fer hémique/fer non hémique. Le Tableau 3 présente quelques études permettant de faire une approximation des concentrations de ces deux sources.

Tableau 3: Teneurs en fer total et pourcentage en fer hémique/non hémique dans la viande de bœuf et de porc.

D'après communication Pretorius *et al.*, Congrès SAAFoST Afrique du Sud 2013

	Fer total (mg/100g)	Pourcentage fer hémique	Pourcentage fer non hémique	
Bœuf	2,5	81	19	Schonfeldt (2013)
	2,1	87	13	Lombardi-Boccia (2002)
	7,7	61	39	Leonhard et Wenk (1997)
	2,3	93	7	Carpentier et Clark (1995)
	3,3	62	38	Kalpalathika (1991)
	2,5	62	38	Schricker (1982)
	Moyenne: 3,4	Moyenne: 74	Moyenne : 26	
Porc	0,8	84	16	Schonfeldt (2013)
	0,4	62	38	Lombardi-Boccia (2002)
	1,9	58	42	Leonhard et Wenk (1997)
	1,0	75	25	Carpentier et Clark (1995)
	1,0	49	51	Schricker (1982)
	Moyenne: 1,4	Moyenne: 67	Moyenne : 33	

Les teneurs en fer total de la viande de bœuf varient de 2.1 à 7.7 avec une moyenne de 3.4 mg de fer pour 100 g de viande. Le pourcentage de fer hémique est plus important (74%) que le pourcentage de fer non hémique (26%). En ce qui concerne la viande de porc (matière première de nombreux saucissons), les teneurs en fer total sont plus faibles et varient de 0.4 à 1.9 mg de fer pour 100 g de viande. En revanche l'écart entre les teneurs en fer hémique et non hémique est moins marqué (67 vs 33%).

Les sources principales de fer hémique dans la viande sont la myoglobine et l'hémoglobine alors que les sources principales non hémique sont la ferritine et la transferrine. Ces protéines peuvent ainsi potentiellement servir de source de fer pour les bactéries dans la viande.

3.2 Les protéines hémiques : l'hémoglobine et la myoglobine

La forme la plus abondante de fer dans les systèmes biologiques (à hauteur de 95%) est le fer hémique. Cette source est nommée hémine lorsque le fer est oxydé ou hématine lorsqu'il est réduit. L'hème est une molécule circulaire, la protoporphyrine IX, contenant en son centre un atome de fer lié par quatre résidus pyrolle (noyau tétrapyrrolle) (Figure 25). L'hème peut représenter pour les bactéries soit une source de fer et de porphyrine pour des espèces comme *S. aureus* (Skaar et al., 2004b), soit uniquement une source de porphyrine comme chez *Lactococcus lactis* (Pedersen et al., 2008).

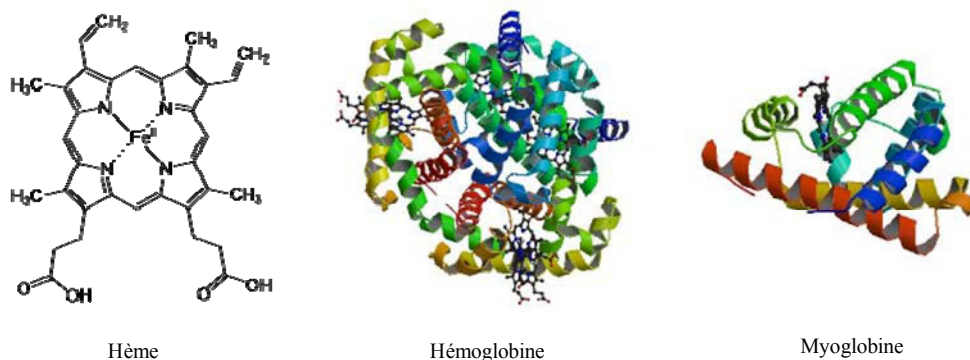


Figure 25: Structure protéique de l'hème, de l'hémoglobine et de la myoglobine (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

L'hémoglobine est une protéine de 80 kDa requise pour le transport de l'oxygène, et est localisée dans les érythrocytes. Elle se présente sous la forme d'un tétramère (2 α et 2 β) et chaque sous-unité fixe une molécule d'hème de façon covalente (Figure 25).

La myoglobine (Figure 25) est une protéine monomérique de 17 kDa abondante dans le muscle et qui lui confère sa couleur rouge. Contrairement à l'hémoglobine, l'hème n'est pas lié de façon covalente à la protéine.

3.3 Les protéines non hémiques : la transferrine et la ferritine

La transferrine est une protéine du sérum qui sert au transport et au contrôle de la concentration de fer libre. Elle est constituée d'une seule chaîne protéique bilobée d'approximativement 80 kDa (Figure 26). La transferrine possède deux sites de fixation du fer. Le site A, localisé dans la région N-terminale, est plutôt associé à la fixation du fer à pH acide. Le site B, localisé dans la région C-terminale, fixerait le fer à des valeurs de pH neutres. Ces sites semblent donc avoir des rôles fonctionnels distincts (Fletcher & Huehns, 1968). La transferrine humaine possède une forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}) à pH 7.4, qui décroît avec la baisse des valeurs de pH (Moos & Morgan, 2000).

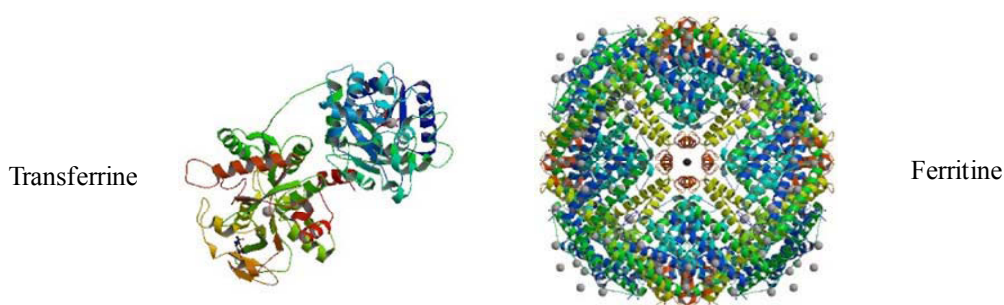


Figure 26: Structure protéique de la transferrine et de la ferritine
(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

La ferritine est présente chez la plupart des organismes vivants au niveau du foie, de la rate et des muscles (Linder *et al.*, 1981). C'est la protéine majeure de stockage dans tous les organismes. Elle est constituée de 24 sous-unités assemblées en forme de sphère avec un diamètre de $\sim 120\text{\AA}$ (Figure 26). Chaque molécule de ferritine de masse moléculaire de 450 000 Da peut fixer 4500 atomes d'ions Fe^{3+} (Le Brun *et al.*, 2010). La ferritine présente une double fonction ; en cas d'excès, elle stocke le fer afin de protéger les cellules de la toxicité du fer et, à l'inverse, elle le libère en cas de carence. Il a été démontré que le stockage du fer dans la ferritine inclut une première étape de liaison du fer ferreux (Fe^{2+}) à la ferroxidase suivie d'une étape d'oxydation au sein du centre de la ferroxidase et finalement l'entrée du fer Fe^{3+} au centre de la ferritine (Carrondo, 2003) (Figure 26).

RESULTATS

ANALYSE IN SILICO

Le séquençage du génome de la souche *S. xylosus* C2a a été réalisé dans le laboratoire avant le commencement de ma thèse. De part les analyses transcriptomiques globales réalisées dans le cadre de mes travaux, d'importantes analyses *in silico* ont été accomplies. J'ai ainsi pu participer à la validation de l'annotation du génome de la souche C2a. La séquence a récemment été rendue publique (LN554884). Je me focaliserai ici sur la description des clusters de gènes que j'ai ciblés pendant ma thèse. La fonction de ces différents gènes est bien décrite dans ma partie bibliographie.

Les clusters liés à l'acquisition et la régulation des nitrites et nitrates: *nir*, *nar* et *nre*

L'analyse du génome de *S. xylosus* C2a a révélé que l'organisation génétique des clusters *nir*, *nar* et *nre* était similaire à celle de la souche TM 300 *S. carnosus*. Le cluster *nir* est composé des gènes *nirRsirAnirBDsirB*, le cluster *nar* est composé des gènes *narGHIT* et le cluster *nre* est composé des gènes *nreABC* (Figure 27).

Cependant :

- l'opéron *nir* ne possède pas le gène *nirC* en amont de *nirR*. Ceci n'influencerait toutefois pas l'activité nitrite réductase chez *S. xylosus* car Neubauer *et al.* (1999) ont montré que la protéine correspondante NirC n'intervenait pas dans cette activité chez *S. carnosus*.
- un pseudogène est intercalé entre les opérons *nir* et *nar*
- un gène est présent en amont de *narT*

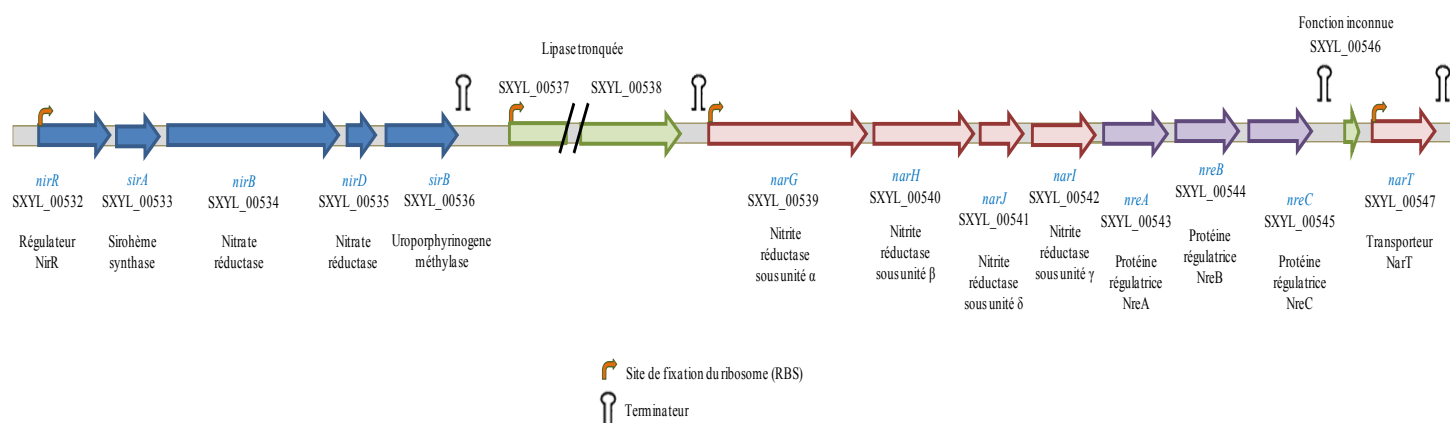


Figure 27: Les clusters *nir*, *nar* et *nre* chez *S. xylosus* C2a

Les clusters liés à l'acquisition et la régulation du fer

Les clusters liés à l'acquisition directe

Les gènes *sitABC* impliqués dans l'acquisition de cations divalents, principalement de fer, et leur régulateur *sirR* ont été identifiés chez la souche *S. xylosus* C2a (Figure 28). Ces clusters ont la même organisation que celle décrite chez la souche *S. epidermidis* RP62A.

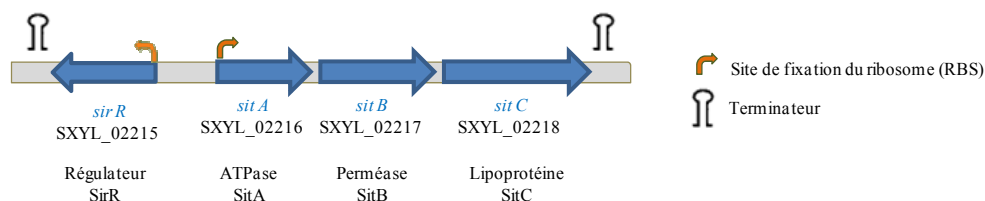


Figure 28: Le cluster *sit* et le gène *sirR* chez *S. xylosus* C2a

Seul un gène du système Isd impliqué dans l'acquisition du fer de l'hème et décrit chez la souche *S. aureus* Newman a été retrouvé chez *S. xylosus*. Il s'agit du gène *isdG* (SXYL_00755) codant une monooxygénase intracellulaire (Figure 29).

Les clusters liés à l'acquisition indirecte

Les clusters *sfaABCD* et *htsABC* codant des protéines impliquées dans la production et le transport de la staphyloferrine A et les clusters *fhuCBG-D1-D2* et *sstABCD* (Figure 29) impliqués dans l'acquisition de sidérophores exogènes ont une organisation similaire aux clusters respectifs décrits chez la souche *S. aureus* Newman.

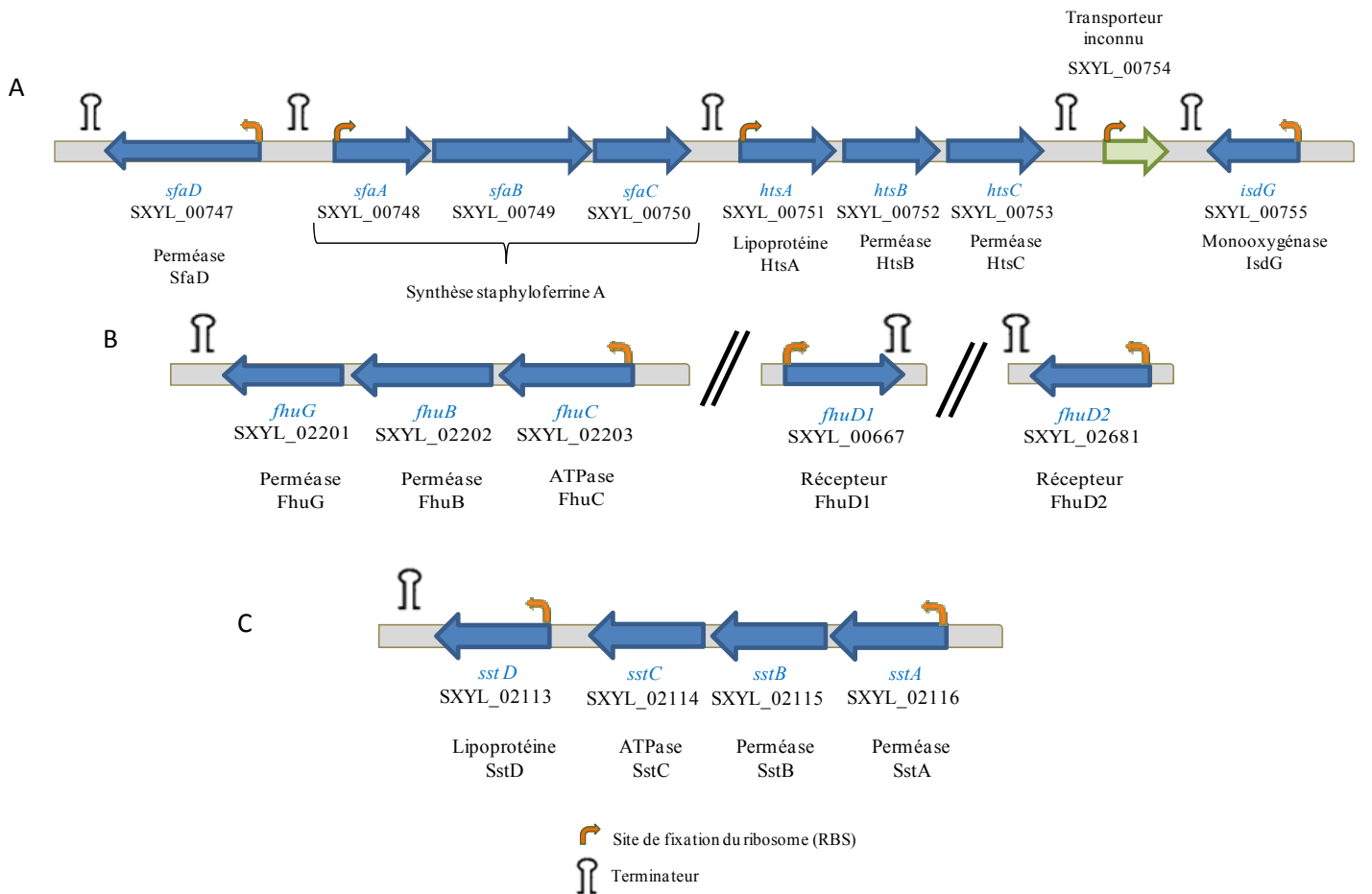


Figure 29: Les clusters (A) *sfa* et *hts*, (B) *fhu* et (C) *sst* chez *S. xylosus* C2a

Les clusters liés à la régulation de l'hème

Les clusters *hssSR* et *hrtAB* du système Hss/Hrt impliqués dans la régulation de l'hème ont été identifiés chez la souche *S. xylosus* C2a et ont une organisation similaire aux clusters *hssSR* et *hrtAB* décrits chez la souche *S. aureus* Newman (Figure 30).

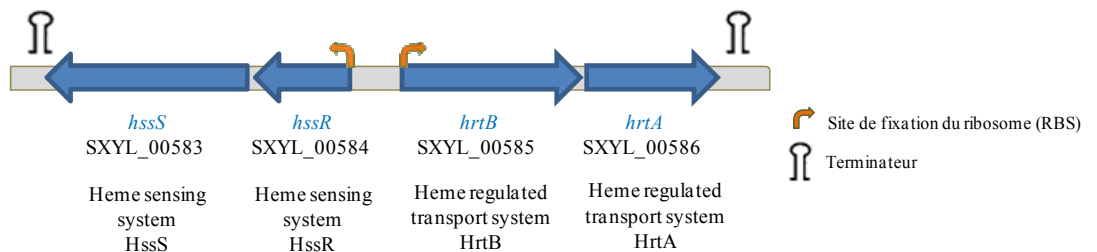


Figure 30: Les clusters *hss/hrt* chez *S. xylosus* C2a

COMPORTEMENT GLOBAL DE LA SOUCHE
***STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* C2A DANS LA**
MATRICE VIANDE

Contexte de l'étude

S. xylosus est un ferment couramment utilisé dans les produits carnés pour son rôle dans le développement des propriétés sensorielles. Les propriétés fonctionnelles telles que les activités antioxydantes (superoxyde dismutase, catalases) contribuant à limiter le rancissement des produits ont été caractérisées *in vitro*. La dégradation des acides aminés à chaîne latérale ramifiée conduisant à des molécules odorantes a été *in vitro* mais aussi en matrice modèle viande. Cependant l'adaptation globale de la physiologie de *S. xylosus* dans la viande n'est pas encore connue.

Nous avons choisi une approche de transcriptomique globale via l'utilisation d'une puce à ADN spécifique de cette espèce afin de déterminer comment le profil d'expression des gènes de *S. xylosus* est modifié au cours de sa croissance et de sa survie dans la viande en prenant comme référence l'inoculum utilisé pourensemencer la viande.

Résultats préliminaires

Extraction des ARN

Afin d'étudier l'expression *in situ* de *S. xylosus*, nous avons dû dans un premier temps développer et optimiser une méthode d'extraction des ARN de la souche C2a directement à partir de la matrice viande. Les ARN ont été extraits à 2, 8, 24, 48 et 72 heures d'incubation. Les approches de transcriptomique basées sur l'hybridation d'une puce à ADN nécessitent d'avoir de l'ARN de qualité en quantité suffisante. Le bilan des extractions d'ARN est présenté dans le tableau 4. Les rendements d'extraction varient entre 13,1 et 17,7 µg d'ARN par gramme de viande. La quantité des ARN totaux extraits varie selon la quantité de bactéries présentes dans les matrices viande (tableau 4). La qualité des ARN extraits des échantillons a été analysée. Les électrophorégrammes sont présentés dans la figure 31. La proportion des ARN au sein d'une cellule est d'environ : ARNr 80%, ARNt 15% et ARNm moins de 5%. Seuls les ARNr 16S et 23S sont présents en quantité suffisante pour être visualisés sur des profils électrophorétiques. Ils servent ainsi d'indicateur de la qualité d'extraction des ARN bactériens. Le premier pic présent sur chaque profil est celui du marqueur de fluorescence. A 24, 48 et 72 heures d'incubation, la présence de deux pics bien distincts représentant les ARNr 16S et 23S nous permet d'extrapoler sur l'intégrité des ARNm de *S. xylosus*. Après 8 heures d'incubation, les pics des ARNr 16S et 23S ne sont que faiblement visibles et à 2 heures d'incubation, aucun pic n'est détecté. Entre le pic du

marqueur de fluorescence et celui de l'ARN 16S, les pics non résolus observés correspondent à des ARN dégradés de viande de porc. Lorsque l'on met en parallèle les électrophorégrammes avec le nombre de bactéries dénombrées dans la viande à chacun des quatre temps, il ressort qu'il faut un minimum de $9,5 \cdot 10^8$ cfu/g de viande pour extraire suffisamment d'ARN de qualité de *S. xylosus* (tableau 4). Ces quantités ne sont atteintes qu'après 24h de croissance bactérienne.

Pour tenter d'améliorer les extractions des ARN de *S. xylosus*, un protocole d'extraction avec séparation des bactéries de la viande a été réalisé. Malgré plusieurs essais, nous n'avons pas pu améliorer l'extraction des ARN de *S. xylosus*, ni en quantité ni en qualité.

Initialement les temps d'incubation 2, 8, 24, 48 et 72 heures devaient être étudiés par l'approche transcriptomique. Seuls les ARN purifiés de *S. xylosus* extraits des conditions 24, 48 et 72 heures ont été de qualité satisfaisante pour cette approche.

Tableau 4: Bilan des extractions des ARN à partir de matrice viande

Temps (heure)	Quantité de bactéries (CFU/g de viande)	Rendement d'extraction (µg ARN/g viande)	Qualité des ARN extraits
2	$7,8 \cdot 10^7$	13,1	-
8	$1,1 \cdot 10^8$	14,8	+/-
24	$9,5 \cdot 10^8$	17,7	+
48	$1,2 \cdot 10^9$	15,9	+
72	$1,7 \cdot 10^9$	16,4	+

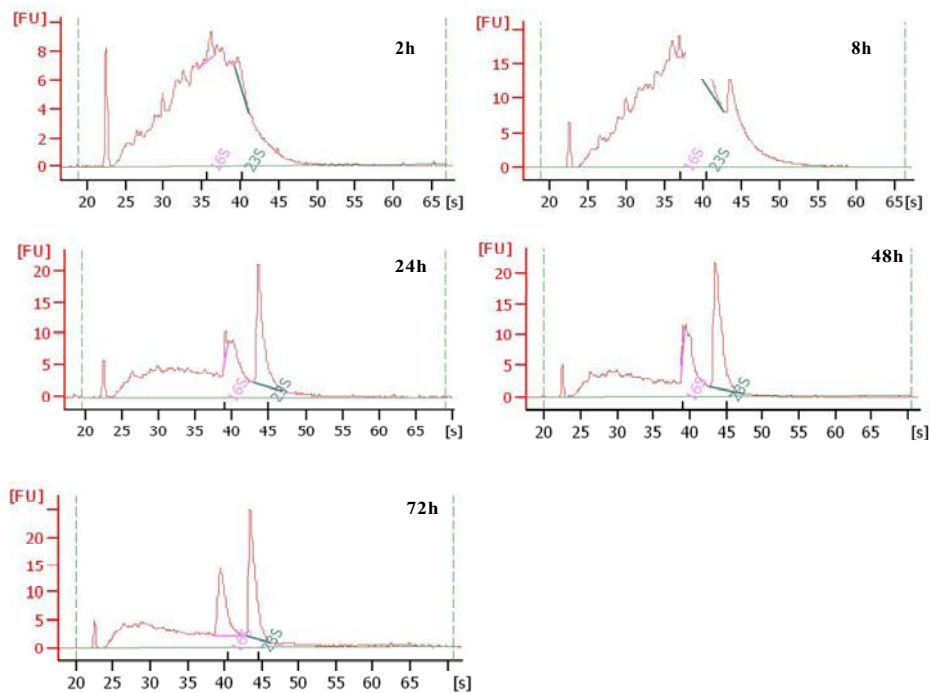


Figure 31: Electrophorèse des ARN totaux extraits à différents temps d’incubation après analyse par la puce Agilent RNA 6000 nano

Création de la plateforme NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)

La création de la plateforme GPL19201 sur le site NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) nous a permis de donner une description complète de la conception de la puce à ADN spécifiquement développé pour la souche *S. xylosus* C2a (Annexe 1). Il s’agit d’une puce de type Agilent où les oligonucléotides de 60 mers sont synthétisés *in situ* directement sur une lame de verre. Une lame comprend quatre puces et chaque puce comprend 30 258 sondes. Parmi elles, 19 805 ciblent les 2 634 gènes présents chez *S. xylosus*. Un gène est ainsi représenté par une moyenne de 6 sondes. Les autres sondes ciblent des régions intergéniques ou servent de contrôle.

Soumission de l’ensemble des données brutes obtenues sur NCBI Gene Expression Omnibus

Les puces à ADN sont scannées puis chaque spot (ou zone d’hybridation) est analysé par le logiciel d’analyse d’images « Feature Extraction » (Agilent, version 9.1.3.1), selon trois étapes : la localisation des spots sur la puce, la segmentation (permettant de classer les pixels composant le spot en tant que signal ou bruit de fond) et l’extraction des données qualitatives

(diamètre, surface, pourcentage de pixels saturés...) et quantitatives (intensité des signaux). Ces données sont filtrées pour éliminer les spots de mauvaises qualités et/ou saturés. Des normalisations intra et inter lames sont effectuées pour minimiser les déséquilibres de niveaux d'intensité entre fluorophores (cyanine 3 ou 5) et réduire la variance des mesures entre les lames. Une stratégie d'analyse a ensuite été mise en place en utilisant un modèle linéaire avec une méthode empirique de Bayes corrigée par la procédure de Benjamini-Hochberg.

Les données brutes concernant l'analyse d'image et la stratégie d'analyse ont été déposées sur le site NCBI GEO et sont en cours de validation pour les échantillons utilisés dans l'Article 1.

Résultats principaux de l'étude

➤ Dans la viande, *S. xylosus* inoculé à un niveau de $5 \cdot 10^7$ CFU/g se multiplie au cours des premières 24 h d'incubation pour atteindre $9 \cdot 10^8$ CFU/g puis le niveau de population se maintient jusqu'à 72 h d'incubation à 22°C. Le pH varie très peu, il passe de 5.9 à 5.7 entre 0 et 72h d'incubation.

➤ L'analyse statistique des résultats obtenus par l'approche de transcriptomique globale fait apparaître 1491 gènes de *S. xylosus* dont l'expression est significativement différente à 24, 48 et/ou 72 heures d'incubation dans la matrice carnée comparée à l'inoculum. Cela correspond à une modification de 55% des gènes de *S. xylosus*. Plus de 50% de ces gènes sont différentiellement exprimés aux trois temps d'incubation. Nous avons focalisé notre analyse, dans une première approche, sur ces 719 gènes.

➤ *S. xylosus* a été cultivé en milieu minimum contenant du glucose (5 g/L), du NH_4 comme source d'azote, trois vitamines et des éléments traces pour la préparation de l'inoculum. Il doit ensuite adapter sa physiologie à la matrice modèle de porc qui contient approximativement de l'eau (72 à 76 g pour 100 g de viande), des protéines (15 à 22 g pour 100 g de viande), des lipides (1.5 à 4.0 g pour 100 g de viande), des minéraux et des traces de sucres ainsi que du glucose (5 g/kg) et du NaCl (27.7 g/kg) ajoutés dans nos conditions pour mimer une mûlée de saucisson. Il doit également s'adapter aux conditions environnementales comme des variations de pH : pH 7 en milieu de culture contre 5.7-5.9 dans la viande.

➤ *S. xylosus* conserve une activité métabolique jusqu'à 72 h d'incubation. Les 719 gènes différentiellement exprimés dans la matrice carnée comparée à l'inoculum révèlent un

changement transcriptionnel majeur qui débute dès 24 heures et qui perdure jusqu'à 72 heures d'incubation. *S. xylosus* surexprime ainsi aux trois temps d'incubation 9 gènes (*rpsDEJH*, *rplCIJL* et *rpmJ*) codant des protéines ribosomales. Les gènes *dnaE* codant la polymérase III, *parCE* codant la topoisomérase IV, *ruvB*, *recGQ1* et *addA* codant des hélicases et *gyrAB* codant des gyrases sont également surexprimés.

➤ *S. xylosus* catabolise le glucose ajouté via la **voie des Pentoses Phosphates**. Les gènes codant des protéines impliquées dans l'acquisition du glucose (*glcU*), sa conversion en gluconate (*gdh*) puis son catabolisme (*gntR* et *gntK*) sont fortement surexprimés. Le catabolisme se poursuit via la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) avec la surexpression de trois gènes (*iolJ*, *tpiA* et *gpml*). Les gènes *manA*, *fruK* et SXYL_00278 sont surexprimés et pourraient alimenter les concentrations de fructose 6-P et de fructose-1,6 bis-P. Les gènes *pflB* et *pdhB* impliqués dans la voie de conversion du pyruvate et les gènes *sdhAC* impliqués dans le cycle TCA et la phosphorylation oxydative sont également surexprimés alors que le gène *ldh* codant la lactate deshydrogenase est sous exprimé.

➤ *S. xylosus* module de nombreux gènes impliqués dans le **métabolisme des acides aminés**. *S. xylosus* est cultivé dans un milieu viande riche en peptides et en acides aminés. Il se fournit en acides aminés en surexprimant les gènes SXYL_01247, SXYL_01248 et *ampS* codant trois peptidases. Dans la viande, *S. xylosus* sous exprime 24 gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés ramifiés (*leuC*, *ilvB*, *ilvD2*), des acides aminés aromatiques (*aroABC*, *trpA*, *aroD*, SXYL_01128), de l'arginine (*argGH*, *arcB*, *argC*, *argB*) et de l'histidine (*hisABCDIEFGZ*, *hutG*). Ces gènes sont régulés par CodY qui est un represser global de la transcription. Par ailleurs *S. xylosus* sous exprime 6 gènes impliqués dans la synthèse de l'arginine (*argB*, *argC*, *arcB*, *argGH*). Ces gènes sont régulés par CcpA. Les gènes *bkdA1*, *bkdA2* codant les deux sous unités de la désydrégénase de céto acide à chaîne latérale ramifiée impliqués dans la dégradation de la leucine sont surexprimés. Enfin sept gènes impliqués dans le métabolisme de l'aspartate et du glutamate sont différenciellement exprimés. Le glutamate est un métabolite clé servant de donneur de NH₄ pour de nombreux composés et d'osmoprotectant pour les cellules.

➤ Dans le modèle viande, *S. xylosus* répond au **stress salin** dû à la présence de NaCl par divers mécanismes. Le gène *mscL* qui code une protéine impliquée dans l'efflux des solutés est sous exprimé ce qui pourrait contribuer à éviter la plasmolyse. Il met en jeu trois systèmes impliqués dans l'accumulation et la synthèse d'un osmoprotectant majeur: la glycine bêtaïne.

Les gènes *cudAT* et les gènes *opuCABCD* et *lcdH* qui codent respectivement des protéines impliquées dans le transport de la choline et la carnitine, et leur catabolisme en glycine bêtaïne sont surexprimés. De plus, trois gènes (*sdaAAl*, *sdaABl*, *glyA*) codant des enzymes impliqués dans la synthèse de la glycine et le gène *metK* codant une S-adénosyl-méthionine servant de donneur méthyl permettant ainsi la synthèse de glycine bêtaïne sont également surexprimés. *S. xylosus* surexprime les gènes *mnh1* et *mnh2* qui codent les protéines de deux systèmes d'antiport $\text{N}^{\text{a}+}(\text{L}^{\text{i}+})/\text{H}^+$ impliqués dans l'excrétion du Na^+ . En parallèle, *S. xylosus* surexprime les gènes *atpABCDEFGH* qui codent les sous unités de l'ATP synthase. Cette pompe à protons excrète des ions H^+ et génère de l'ATP. Elle sert à maintenir le pH intracellulaire. Les gènes *dltDB* sont surexprimés, ils codent des enzymes impliqués dans l'alanylation des acides teichoïques modifiant leur charge. Le degré de D-alanylation peut varier selon les conditions environnementales comme des changements de pH, de température ou de sel.

Article 1

Version préliminaire
Non soumise

Global transcriptome response of *Staphylococcus xylosus* in meat model

Aurore Vermassen ⁽¹⁾, Sabine Leroy ⁽¹⁾, Anne de La Foye ⁽²⁾,
Pierre Micheau ⁽¹⁾, Emilie Dordet-Frisoni ⁽¹⁾, Régine Talon ⁽¹⁾

INRA, UR454 Microbiologie ⁽¹⁾, 63122 Saint-Genès Champanelle, France
INRA, Plateforme d'Exploration du Métabolisme ⁽²⁾, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

INTRODUCTION

Coagulase Negative Staphylococci (CNS) are commensal of the skin and mucous membranes of mammals, and consequently there are frequently isolated from fermented products of animal origin. *S. xylosus*, *S. equorum* and *S. saprophyticus* are considered as the three most prevalent species isolated from traditional fermented sausages and cheeses (Coton *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2010). *S. xylosus* with *Staphylococcus carnosus* are the two main staphylococcal species used starter cultures for meat fermentation. They are commonly associated with lactic acid bacteria (Leroy *et al.*, 2006; Ravyts *et al.*, 2012).

S. xylosus is recognized to play an important role in color and flavor and development of meat products (Talon & Leroy, 2006). Its contribution to the color is associated to the addition of nitrate during sausage manufacturing. It is able to reduce nitrate to nitrite thanks to a nitrate reductase activity.

S. xylosus contributes to the flavor development mainly through its antioxidant properties. During fermentation, lipid oxidation occurred and generated aldehydes that contribute to the flavor but in excess these compounds will be responsible of rancid off-flavors (Berdague *et al.*, 1993). Peroxidation corresponds to the chemical reaction between unsaturated fatty acids and the reactive forms of oxygen, such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH^{\cdot}). *S. xylosus* is well equipped with genes encoding enzymes such one superoxide dismutase, three catalases and diverse peroxidases, contributing in synergy to limit oxidation (Barrière *et al.*, 2001a; Barrière *et al.*, 2001b; Barrière *et al.*, 2002).

S. xylosus contributes also to the flavor development through its amino and fatty acids catabolism leading to the production of volatile compounds (Stahnke, 1999; Talon & Leroy, 2006; Tjener *et al.*, 2004). The conversion of branched chain amino acids (leucine, isoleucine, valine) resulted into methyl-aldehydes, - alcohols and -acids with odorous properties. The first step of the catabolism of these amino acids is a transaminase reaction in which the amino group is transferred to a α -ketoacid (Beck *et al.*, 2004). *S. xylosus* have been associated to the production of 3-methyl butanol, 3-methyl butanal and 3-methyl butanoic acid from leucine *in vitro* (Beck *et al.*, 2004). Fatty acids through their incomplete β -oxidation lead to the production of ketones that contribute to flavor. During this incomplete pathway, intermediate CoA esters can be successively converted into β -ketoacids via thioesterase activity and then into ketones via a decarboxylase reaction. It has been shown *in vitro* that *S. xylosus*, like *S. carnosus*, has thioesterase and decarboxylase activities leading to the production of ketones (Engelvin *et al.*, 2000; Fadda *et al.*, 2002). In meat model, *S. xylosus* was shown to be able to produce the methyl volatiles compounds listed above but also methyl-ketone arising from branched chain amino acids and 2-pentanone arising from hexanoic acid (Stahnke, 1999).

Some technological properties are well characterized *in vitro* in *S. xylosus*. However the molecular mechanisms involved in the adaptation of the bacteria in meat product remained unknown. In this study, we analysed the transcriptome of *S. xylosus* in a meat model incubated until 72 hours at 22°C in conditions that mimic the fermentation step. The *in situ* response of *S. xylosus* was analyzed *versus* the *S. xylosus* culture used as inoculum. The results highlighted a total change in the gene expression during survival of *S. xylosus* in the meat model traducing the adaptation to nutrients and to osmotic stress.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the inoculum and inoculation of the meat model

The *S. xylosus* C2a strain is derived from the type strain DSM20267 cured of its endogenous plasmid pSX267. We used this laboratory strain as it is the only one with some genetic background. Moreover, its complete genome has been sequenced (LN554884). The strain was cultured overnight at 30°C under agitation (150 rpm) in the minimal medium as described (Fiegler & Brückner, 1997). The culture was briefly centrifuged and part of the cell pellet constituted the inoculum was immediately frozen in liquid nitrogen before extraction of RNA. Three independent experiments were done.

Another part of the cell pellet was resuspended in physiological serum and inoculated at 10^7 CFU/g of meat model containing per kg: 5 g of glucose and 27.7 g of NaCl. After inoculation the meat was distributed in glass Petri dishes and incubated at 22°C in a wet atmosphere. At 24, 48 and 72 h of incubation, aliquots of 200 mg meat samples were taken and immediately frozen in liquid nitrogen to stabilize the bacterial RNA. Three independent experiments were done.

To evaluate the inoculum and the growth of *S. xylosus* in meat, bacteria were enumerated after serial dilutions on plates of brain-heart infusion agar, which were incubated at 30°C for 24 h.

RNA extraction, labeling and microarray analyses

Briefly, total RNA of *S. xylosus* was extracted from the inoculum or directly in meat after 24, 48 or 72 hours of incubation. Bacteria were lysed in acid phenol (inoculum) or in Trizol reagent (meat) with zirconia-silica beads (0.1 mm-diameter) in a FastPrep instrument. RNA was purified with the kit Nucleospin RNA II (Macherey Nagel). RNA from each sample was reverse transcribed to cDNA (Invitrogen, Superscript Reverse Transcriptase) and the RNA-cDNA hybrid was digested by RNase H (Invitrogen). The cDNA was labeled by cyanine 3 or cyanine 5 by the kit Bioprime DNA (Invitrogen). Unincorporated Cy-dye was removed using CentriSep column (Applied Biosystem). The experimentation was realized in dye swap. Cyanine 3/cDNA and cyanine 5/cDNA were hybridized.

The DNA microarray used has been developed for *S. xylosus* C2a. A complete description of the array is available at the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under platform accession number GPL19201.

Microarrays were scanned in a SYS-SN-ARRAY Agilent Microarray Scanner (5- μ m resolution) with a coefficient of photomultiplication of 30%. Microarrays were analyzed by the Feature extraction software (Agilent, version 9.1.3.1) in 3 steps: localization of the spots, segmentation of the pixels and extraction of qualitative and quantitative data. These data were filtered to remove spots that were saturated or of poor quality. Within each array, Cy3/Cy5 log-ratios were normalized to correct for the mean spot intensity-dependent dye effect. Significant differences in the probe set intensities between the two conditions were identified using a linear model with an empirical Bayes method using all information probes to moderate the standard errors of the estimated log-fold changes (Smith, 2004). The probabilities were corrected by the Benjamini-Hochberg procedure in order to control the false-discovery rate (FDR) with a p value cut-off of 0.05. All the probes with an $FDR \leq 0.05$ are considered to be differentially expressed. Finally, one gene was considered to be differentially expressed if at least 66% of the corresponding probes were differentially expressed and if the ratio of expression was upper than 2 or lower than 0.5.

Quantitative PCR (qPCR)

To determine the validity of the microarray data, transcript level changes obtained with the microarray analysis were compared with those from quantitative PCR. We performed the quantitative PCR by using Real Plex Master Cyclor (Eppendorf) with IQTM SYBR®Green

Supermix (Rad Laboratories). Thermal cycling consisted of 30 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C. The targeted genes and primer sequences are listed in supplementary Table 1. All genes were quantified in duplicate for the three independent experiments. The analyses were performed on the same samples of RNA as used for the microarray experiments. The relative fold change of gene expression, using measured *tuf* housekeeping gene expression, was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

Microarray data accession number

In progress (NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database)

RESULTS AND DISCUSSION

Growth and survival of *S. xylosus* in the meat model and transcriptome profile

S. xylosus was collected at the stationary phase of growth and was inoculated in the meat model at 5×10^7 CFU/ml. The growth of *S. xylosus* in the meat model was exponential until 24 h and reached 9×10^8 CFU/g. It remained in the stationary phase until the end of the experiment (72h). The pH was measured at each point between t_{0h} and t_{72h} . A weak acidification was observed in the meat model, the pH values were near 5.9 at t_{0h} and near 5.7 at t_{72h} .

The *in situ S. xylosus* response revealed a total change in the gene expression during its survival in the meat model. A total of 1491 genes was differentially expressed in meat at 24, 48 or 72 hours of incubation by comparison with the inoculum. It corresponded to a modification of 55% of the genome. There were 1199, 1192 and 920 genes differentially expressed at 24, 48 and 72 h respectively (Figure 1). Approximately 55% (719/1491) of these genes were differentially expressed at the three times of incubation.

To validate the microarray analysis independently, the relative expression of 47 differentially expressed genes representing 6.5% of the common genes with significantly modified expression was measured by qPCR (Supplementary Table 1). The microarray and qPCR results for the tested genes were strongly correlated for the three times of incubation (24h: $r^2 = 0.929$ and slope = 1.236x, 48h $r^2 = 0.914$ and slope = 1.275x, 72h $r^2 = 0.889$ and slope = 1.397x) and the expected trend in the expression pattern was confirmed (Figure 2).

To have a global view, we first focused specifically on the 719 common genes with 310 up- and 409 down-regulated (Figure 1). The 719 common genes differentially expressed in meat have been classified into different functional categories; the most represented being the information storage and processing, the cellular processes and the metabolism (Figure 3). The expression of many genes involved in energy production and conversion, carbohydrate and amino acid transport and metabolism was up expressed.

The 719 common genes differentially expressed between the inoculum and the culture in meat indicate that major transcriptional changes have occurred at 24 h and lasted during all the incubation time (72 h). The inoculum of *S. xylosus* was grown in a minimal medium with glucose as carbon source (5 g/l), NH₄ as nitrogen source, 3 vitamins and trace elements. It has then to adapt its physiology to a pork meat model medium with an approximate composition (expressed as g/ per 100 g) of water (72-76), proteins (15-22), lipids (1.5-4.0), minerals and trace amounts of carbohydrate (Toldrá, 2008) with glucose and NaCl added in our conditions. Furthermore it has to adapt to different environmental conditions: pH variations (pH 5.9 in meat versus 7.0), solid medium versus liquid one.

***S. xylosus* kept a metabolic activity up to 72 h**

S. xylosus remained metabolically active during its survival in the meat model until 72 h. Thus 9 genes encoding the ribosomal proteins were over expressed. Ten genes encoding DNA replication and recombination such as polymerase III (*dnaE*), topoisomerase IV (*parCE*), helicases (*dnaB*, *ruvB*, *recG*, *recQI*, *add*) and gyrases (*gyrAB*) were over expressed (Table 1). *L. lactis* grown in cheese has still a metabolic activity after 7 days but a general slowdown was noticed after 24h corresponding to the growth arrest (Cretenet *et al.*, 2011). In our condition, even if *S. xylosus* entered the stationary phase at 24 h, no decrease in the metabolic activity was noticed until 72h. The meat model is a rich media, glucose was added and others nutrients (peptides, amino acids...) are present and metabolized by the bacteria as highlighted by the transcriptomic profile.

Table 1. Genes of *Staphylococcus xylosus* discussed in this study differentially expressed at t_{24h}, t_{48h} and t_{72h} in the meat model with ratio upper than 2 or lower than 0.5

Functional category and family	Gene ID	Gene name	Protein	Mean ratio of expression		
				24h	48h	72h
DNA translation, réplication, recombination and repair						
Translation	SXYL_01145	rpsD	30S ribosomal protein S4	4.97	3.29	3.28
	SXYL_00704	rpsJ	30S ribosomal protein S10	5.63	2.49	2.30
	SXYL_00722	rpsE	30S ribosomal protein S5	4.99	2.31	2.15
	SXYL_02380	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	4.28	2.47	2.42
	SXYL_02381	rplJ	50S ribosomal protein L10	8.75	4.47	4.17
	SXYL_00015	rplI	50S ribosomal protein L9	3.13	2.84	2.12
	SXYL_00705	rplC	50S ribosomal protein L3	6.07	3.22	2.82
	SXYL_00719	rpsH	30S ribosomal protein S8	5.01	2.60	2.02
	SXYL_00728	rpmJ	50S ribosomal protein L36	4.85	2.59	2.25
Replication, recombination and repair	SXYL_01165	dnaE	DNA polymerase III subunit alpha	2.62	3.51	2.60
	SXYL_01529	parC	DNA topoisomerase 4 subunit A	5.33	4.71	3.23
	SXYL_01530	parE	DNA topoisomerase 4 subunit B	4.63	2.99	2.58
	SXYL_01219	ruvB	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvB	4.23	3.42	2.52
	SXYL_00016	dnaB	Replicative DNA helicase	4.90	4.40	3.65
	SXYL_01659	recG	ATP-dependent DNA helicase RecG	3.76	3.97	2.60
	SXYL_01954	addA	ATP-dependent helicase/nuclease subunit A	4.04	3.44	2.40
	SXYL_02129	recQI	ATP-dependent DNA helicase RecQ	4.80	7.02	5.03
	SXYL_00005	gyrB	DNA gyrase subunit B	3.12	3.01	2.27
	SXYL_00006	gyrA	DNA gyrase subunit A	4.37	4.78	3.34
Carbohydrates metabolism						
Transport	SXYL_00555	scrA	PTS system, sucrose-specific IIBC component	0.24	0.33	0.43
	SXYL_02457	treP	PTS system, trehalose-specific IIBC component	0.06	0.09	0.18
	SXYL_00278		PTS system, fructose-specific IIBC components	4.41	8.76	5.37
	SXYL_01578	glpF	Glycerol uptake facilitator	0.22	0.27	0.34
Pentose phosphate pathway	SXYL_00439	gntK	Gluconokinase	25.03	51.43	18.73

Embden-Meyerhof-Parnas pathway	SXYL_00438	<i>gntR</i>	Gluconate operon transcriptional repressor	28.09	39.49	14.23
	SXYL_00698	<i>gdh</i>	Glucose 1-dehydrogenase	3.04	3.23	2.83
	SXYL_00699	<i>glcU</i>	Glucose uptake protein	10.18	7.82	5.42
	SXYL_00792	<i>rbsK</i>	Ribokinase	0.43	0.38	0.29
	SXYL_00279	<i>manA</i>	Mannose-6-phosphate isomerase, class I	6.11	11.79	5.72
	SXYL_02149	<i>fruK</i>	Tagatose-6-phosphate kinase	3.09	2.89	2.16
	SXYL_00278		PTS system, fructose-specific IIABC components	4.41	8.76	5.37
	SXYL_00039	<i>iolJ</i>	Fructose-bisphosphate aldolase, class II	3.77	6.43	4.89
	SXYL_02068	<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	6.96	4.81	3.12
	SXYL_01179	<i>gapA2</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	0.00	0.02	0.10
Pyruvate metabolism	SXYL_02067	<i>gpmI</i>	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	7.60	5.26	3.15
	SXYL_00514	<i>gpmA</i>	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	0.31	0.42	0.45
	SXYL_01576	<i>glpD</i>	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.14	0.16	0.20
	SXYL_00276	<i>ldh2</i>	Lactate dehydrogenase	0.21	0.27	0.36
	SXYL_01024	<i>pflB</i>	Formate acetyltransferase	2.19	2.52	2.25
TCA cycle and respiratory chain	SXYL_01841	<i>pdhB</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	5.61	4.86	3.44
	SXYL_01794	<i>sdhA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	2.22	3.67	3.77
	SXYL_01795	<i>sdhC</i>	Succinate dehydrogenase cytochrome b558 subunit	3.84	5.08	4.83
	SXYL_00823		Putative ATP synthase protein I	7.28	3.69	2.61
	SXYL_00824	<i>atpB</i>	ATP synthase subunit a	6.39	3.59	3.00
	SXYL_00825	<i>atpE</i>	ATP synthase subunit c	6.12	2.97	2.47
	SXYL_00826	<i>atpF</i>	ATP synthase subunit b	7.90	4.13	2.99
	SXYL_00827	<i>atpH</i>	ATP synthase subunit delta	8.04	4.56	3.27
	SXYL_00828	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit alpha	11.35	7.78	5.58
	SXYL_00829	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	13.87	10.16	6.92
Regulators	SXYL_00830	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta	9.66	7.63	5.40
	SXYL_00831	<i>atpC</i>	ATP synthase epsilon chain	7.35	5.26	3.90
	SXYL_00053	<i>crtM</i>	Dehydrosqualene synthase	9.24	9.13	5.66
	SXYL_00530		Putative formate nitrite family of transporter	2.87	2.19	2.36
	SXYL_00540	<i>narH</i>	Respiratory nitrate reductase, beta subunit	6.50	4.62	3.73
	SXYL_00541	<i>narJ</i>	Respiratory nitrate reductase, delta subunit	5.07	3.89	3.06
	SXYL_00883	<i>rex</i>	Redox-sensing transcriptional repressor Rex	0.44	0.37	0.43
	Amino acids metabolism					
	Peptidase					
	SXYL_00957	<i>ampS</i>	Leucyl aminopeptidase	3.36	2.74	2.16
Branched amino acids	SXYL_00948	<i>map</i>	Methionine aminopeptidase	3.03	3.05	2.02
	SXYL_01247		U32 family peptidase	5.77	4.41	3.10
	SXYL_01248		U32 family peptidase	5.79	4.55	3.27
	SXYL_00869	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	0.34	0.05	0.09
	SXYL_00874	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase	0.23	0.06	0.12
	SXYL_02469	<i>ilvD2</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	0.18	0.11	0.14

Aromatic amino acids	SXYL_01338	<i>bkdA1</i>	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 alpha subunit	6.72	4.62	3.33
	SXYL_01339	<i>bkdA2</i>	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit	4.48	3.45	2.87
	SXYL_01383	<i>aroC</i>	Chorismate synthase	0.27	0.17	0.24
	SXYL_01384	<i>aroB</i>	3-dehydroquinate synthase	0.28	0.19	0.25
	SXYL_01385	<i>aroA</i>	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	0.29	0.17	0.22
	SXYL_01497	<i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain	0.38	0.38	0.45
	SXYL_02022	<i>aroD</i>	3-dehydroquinate dehydratase	0.25	0.27	0.33
	SXYL_01128		DAHP synthetase-chorismate mutase	0.06	0.04	0.06
Histidine	SXYL_00460	<i>hisIE</i>	Bifunctional phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase/phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	0.03	0.03	0.03
	SXYL_00461	<i>hisF</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	0.02	0.02	0.03
	SXYL_00462	<i>hisA</i>	(5'-phospho-L-ribosyl-formimino)-5-amino-1-(5'-phosphoribosyl)-4-imidazolecarboxamide isomerase	0.03	0.02	0.03
	SXYL_00463	<i>hisH</i>	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisH	0.03	0.03	0.02
	SXYL_00464	<i>hisB</i>	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	0.03	0.02	0.03
	SXYL_00465	<i>hisC</i>	Histidinol-phosphate aminotransferase	0.03	0.02	0.03
	SXYL_00466	<i>hisD</i>	Histidinol dehydrogenase	0.06	0.05	0.06
	SXYL_00467	<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	0.09	0.08	0.09
Cysteine, methionine	SXYL_00468	<i>hisZ</i>	ATP phosphoribosyltransferase regulatory subunit	0.11	0.09	0.12
	SXYL_00614	<i>hutG</i>	Formimidoylglutamase	0.08	0.24	0.33
	SXYL_02644	<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	0.12	0.13	0.19
	SXYL_00372		D-cysteine desulfhydrase	0.26	0.39	0.44
	SXYL_01961	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	0.41	0.24	0.24
	SXYL_01962	<i>argH</i>	Argininosuccinate lyase	0.29	0.18	0.19
	SXYL_00252	<i>arcB</i>	Ornithine carbamoyltransferase	0.31	0.33	0.38
	SXYL_00239	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	0.42	0.27	0.37
Alanine, aspartate, glutamate	SXYL_00241	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	0.24	0.17	0.22
	SXYL_01373	<i>ansA</i>	L-asparaginase	2.59	2.81	2.40
	SXYL_01002	<i>panD</i>	Aspartate 1-decarboxylase	0.37	0.19	0.25
	SXYL_01558		Aspartokinase	0.39	0.29	0.41
	SXYL_02393	<i>gltX</i>	Glutamate--tRNA ligase	3.77	5.33	3.80
	SXYL_00107		Glutamine synthetase	41.68	29.19	15.72
	SXYL_00108	<i>gabD</i>	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	41.29	29.52	15.40
	SXYL_01792	<i>murI</i>	Glutamate racemase	0.34	0.26	0.23
Osmoprotectant	SXYL_01355	<i>proC</i>	Pyrroline-5-carboxylate reductase	0.33	0.26	0.30
	Osmotique stress					
	SXYL_00225	<i>cudA</i>	Glycine betaine aldehyde dehydrogenase	7.76	2.95	4.28
	SXYL_00223	<i>cudT</i>	Choline transporter	17.56	5.25	4.61
	SXYL_00488	<i>opuCA</i>	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	16.24	3.88	2.89

	SXYL_00489	<i>opuCB</i>	ABC-type proline glycine betaine transport system permease component	18.43	5.47	3.75
	SXYL_00490	<i>opuCC</i>	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter opuCC	34.34	6.49	4.63
	SXYL_00491	<i>opuCD</i>	ABC-type proline glycine betaine transport system permease component	30.13	8.60	5.80
	SXYL_00486	<i>lcdH</i>	L-carnitine dehydrogenase	22.75	5.03	3.31
	SXYL_00820	<i>glyA</i>	Serine hydroxymethyltransferase	10.66	7.37	5.40
	SXYL_02529	<i>sdaAB1</i>	L-serine dehydratase subunit beta	3.98	4.62	3.40
	SXYL_02528	<i>sdaAA1</i>	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit	3.65	5.47	4.53
	SXYL_01084	<i>metK</i>	S-adenosylmethionine synthetase	6.76	8.33	4.81
Efflux solute	SXYL_01536	<i>mscL</i>	Large-conductance mechanosensitive channel	0.29	0.25	0.28
Cell envelope remodelling	SXYL_01987	<i>dltD</i>	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD	8.13	6.11	3.22
	SXYL_01989	<i>dltB</i>	D-alanyl transfer protein DltB	7.00	4.22	2.49
Extrusion of Na⁺	SXYL_01970	<i>mnhA1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit A1	6.18	5.54	2.95
	SXYL_01971	<i>mnhB1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit B1	7.30	7.76	3.79
	SXYL_01972	<i>mnhC1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit C1	6.74	6.11	3.29
	SXYL_01973	<i>mnhD1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit D1	8.36	7.99	3.73
	SXYL_01974	<i>mnhE1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit E1	4.75	5.70	2.91
	SXYL_01975	<i>mnhF1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit F1	5.54	6.14	3.30
	SXYL_02220	<i>mnhG2</i>	Putative antiporter subunit G2	2.59	2.70	2.07
	SXYL_02221	<i>mnhF2</i>	Putative antiporter subunit F2	5.06	4.90	3.05
	SXYL_02222	<i>mnhE2</i>	Putative antiporter subunit E2	5.49	5.08	2.92
	SXYL_02223	<i>mnhD2</i>	Putative antiporter subunit D2	5.73	5.58	3.17
	SXYL_02224	<i>mnhC2</i>	Putative antiporter subunit C1	4.73	4.24	2.54
	SXYL_02225	<i>mnhB2</i>	Putative antiporter subunit B2	4.80	4.44	2.56
	SXYL_02226	<i>mnhA2</i>	Putative antiporter subunit A2	5.34	5.04	3.14
Regulators	SXYL_00859	<i>rsbU</i>	Serine phosphatase RsbU regulator of sigma subunit	4.21	2.94	2.84
	SXYL_00860	<i>rsbV</i>	Anti-sigma-B factor antagonist	0.26	0.22	0.22
	SXYL_00861	<i>rsbW</i>	Serine-protein kinase RsbW	0.21	0.23	0.20
	SXYL_00951	<i>vraS</i>	Sensor protein VraS	3.79	4.64	2.71

Glucose is catabolised via gluconate in the meat model during its survival

The central routes of glucose metabolism in staphylococci are the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) and the Pentose Phosphate (PP) pathways. Depending of the growth conditions, the majority of glucose (85%) is catabolised via the EMP pathway (Brückner & Rosenstein, 2006). In meat, *S. xylosus* catabolised glucose via the PP pathway for its survival in stationary phase. Genes involved in the glucose uptake (*glcU*) and in the gluconate catabolism (*gdh*, *gntR*, *gntK*) were highly up expressed (Table 1). In *S. xylosus*, *glcU* and *gdh* are co-localised and co-expressed suggesting that GlcU recruits glucose for glucose dehydrogenase (Fiegler *et al.*, 1999). GlcU serves additionally to the PTS to take up glucose during growth in laboratory media in *S. xylosus* (Fiegler *et al.*, 1999). Noteworthy, in meat model during the stationary phase, only *glcU* was over expressed while two genes *trep* and *scrA* coding PTS-trehalose and PTS-sucrose were down regulated probably *via* the catabolite control protein CcpA (Brückner

& Titgemeyer, 2002) (Table 1). Also two genes *glpF* and *glpD* of the cluster *glpFKD* involved in glycerol transport and catabolism were down regulated (Table 1). Production of gluconate opens an alternative route to obtain energy from glucose. The gene *gdh* encodes glucose 1-dehydrogenase catalyzing D-glucose in D-glucono-1,5-lactone that can lead to gluconate by spontaneous hydrolysis (Zamboni *et al.*, 2004). We identified a cluster of 4 genes involved in gluconate utilisation; *gntR*, *gntK*, *gntP* encoding a regulator, a kinase and a permease, respectively, and a gene encoding a 2-deoxy-D-gluconate-3 dehydrogenase. This cluster has similar genetic organization of the gluconate *gntRKPZ* operon of *Bacillus subtilis* (Fujita *et al.*, 1986); the role of GntZ remains to be determined (Zamboni *et al.*, 2004). The *B. subtilis* *gnt* operon is negatively regulated by GntR which is antagonized by gluconate that interferes with the binding of the regulator with its target promoter (Yoshida *et al.*, 1995). Expression of *gnt* operon in *B. subtilis* is also subjected to carbon catabolite repression by the CcpA (Reizer *et al.*, 1996). In *Corynebacterium glutamicum*, two functionally equivalent regulators, GntR1 and GntR2, coordinately regulate gluconate catabolism and glucose uptake (Frunzke *et al.*, 2008). In our condition, gluconate 6-P could be further metabolized in the PP and entered the EMP pathways via the fructose 6-P or the D-glyceraldehyde 3-P. Three genes, *iolJ*, *tpiA* and *gpml* of the EMP were up-expressed but the gene *gapA* was down regulated (Table 1). In parallel, the gene *manA* and two genes, SXYL_00278 coding a PTS-fructose and *fruK* were up regulated and could fuel the EMP at the level of fructose 6-P and fructose-1,6 bis-P (Table 1). Finally, the expression of genes involved in alternative pathways of pyruvate conversion was modulated; *ldh2* coding for lactate was down regulated while *pflB* encoding formate acetyltransferase and *pdhB* belonging of a cluster of 4 genes (*pdhA,B,C,D*) coding pyruvate dehydrogenase complex were up regulated (Table 1). Acetyl-CoA could be then catabolised through the TCA cycle and the respiratory chain, two genes *sdh* (*sdhA*, *sdhC*) encoding succinate dehydrogenase involved in both pathways were up regulated (Table 1). Noteworthy, the gene *gabD* encoding the succinate-semialdehyde dehydrogenase involved in synthesis of succinate was highly induced (Table 1). Finally, the gene *crtM* involved in ubiquinone synthesis, 8 genes encoding the different subunits of the F₀F₁-type ATP synthase complex (*atpA,B,C,D,E,F,G,H*) and the gene SXYL_00823 upstream the *atp* cluster encoding a putative ATP synthase protein I were highly over-expressed and could furnish energy for the survival of *S. xylosus* in meat (Table 1). The gene *atpI* upstream the *atp* cluster has been identified in *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus hirae* but the role of the AtpI in the biology of bacterial ATPase is still unknown (Cotter & Hill, 2003). The transcription of several genes involved in EMP and PP pathways, together with the up regulation of genes (*narH*, *narJ*) related to nitrate respiration and SXYL-00530 encoding a putative nitrite transport although nitrate and nitrite were not present and *pflB* suggested anaerobic growth conditions as mentioned for *S. aureus* (Fuchs *et al.*, 2007) (Table 1). But unlike *S. xylosus*, *S. aureus* undergoes mix-acid and butanediol fermentation under anaerobic conditions (Fuchs *et al.*, 2007). In parallel the up regulation of *pdhB* gene and *atp* cluster suggested aerobic growth conditions of *S. xylosus*. Oxygen concentration in the meat model seemed to be heterogenic and thus *S. xylosus* has to cope with varying concentration of oxygen. In *S. aureus* a redox sensing transcriptional repressor Rex is involved in the regulation of anaerobic gene expression (Pagels *et al.*, 2010). The binding activity of Rex is enhanced by NAD⁺ while NADH decreases it. Rex regulates the expression of pathways that lead to anaerobic NAD⁺ regeneration, nitrate respiration and ATP synthesis. In our study, the transcript of the repressor *rex* was found down expressed explaining the over expression of genes involved EMP and PP pathways, nitrate respiration and ATP synthesis as for *S. aureus*.

Amino acid metabolism and glutamate, a key component in meat

Proteins are the most important component of meat and they are classified as water soluble (sarcoplasmic, 30%), soluble in high salt concentration (myofibrillar, 55%) and insoluble (stromal proteins, proteins from connective tissue) (Lafarga & Hayes, 2014). The sarcoplasmic and myofibrillar proteins are hydrolyzed during the fermentation and the ripening of fermented sausages (Hughes *et al.*, 2002). The initial degradation is essentially due to the activity of endogenous proteinases that release peptides that can be further hydrolyzed by bacterial enzymes (Hughes *et al.*, 2002). In our study, two genes (SXYL_01247, SXYL_01248) encoding peptidases from U32 family, *ampS* and *map* encoding leucyl- and methionine- aminopeptidases respectively were overexpressed, these peptidases will be a source of free amino acids for *S. xylosus* (Table 1). The starters *Lactobacillus sakei*, *S. carnosus* and *Pediococcus pentosaceus*, *S. xylosus* were shown to influence proteolytic activity and release of amino acids in sausages (Aro Aro *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2002). *L. sakei* over expressed two dipeptidases in the presence of sarcoplasmic proteins (Fadda *et al.*, 2010). Peptidases such as X-prolyl-dipeptidyl peptidase (Sanz & Toldra, 2001) and pepR have been identified in *L. sakei* and the gene *pepR* is positively regulated by anaerobiosis (Champomier-Vergès *et al.*, 2002).

Variable levels (160 mg/100 g, 352 mg/100g dry matter) and broad patterns of free amino acids (from 14 to 17 amino acids) were analyzed in batters (Aro Aro *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2002). Thus in the meat model, *S. xylosus* down regulated 26 genes involved in metabolism of branched chain amino acids (*leuC*, *ilvB*, *ilvD2*), aromatic amino acids (*aroABC*, *trpA*, *aroD*, SXYL_01128), arginine (*argGH*, *arcB*, *argC*, *argB*), histidine (*hisABCDIEFGZ*, *hutG*) and cysteine, methionine (*metE*, SXYL_00372) (Table 1). In *S. aureus*, CodY contributes to the regulation of more than 200 genes including most of the ones listed above (Majerczyk *et al.*, 2010). CodY is a global transcriptional repressor that controls genes involved in nitrogen utilization and its activity is regulated in response to the total nutritional state of the cell. CodY repression occurs in *Bacillus* cells growing in a medium containing glucose and amino acids (Shivers & Sonenshein, 2004). CodY is a conserved regulatory protein of stationary phase adaptation in low G+C Gram positive species; it has been identified in *S. xylosus* during its growth in biofilm (Planchon *et al.*, 2009). In *S. aureus* and *B. subtilis*, CodY is activated by high level of GTP, GTP enables to monitor the nutritional state of the cell. Furthermore, branched chain amino acids increase the affinity of CodY for the target genes (Majerczyk *et al.*, 2010; Shivers & Sonenshein, 2004).

S. xylosus down expressed also 6 genes involved in synthesis of arginine (*argB*, *argC*, *arcB*, *argGH*, *proC*) (Table 1). In *S. aureus*, arginine biosynthesis is regulated through the global regulator CcpA, it was shown that a mutant *ccpA* facilitates the synthesis of arginine via the urea cycle utilising proline as substrate (Nuxoll *et al.*, 2012). In our condition, the pathway is also down regulated via urea cycle but with glutamate as substrate.

If the genes encoding the synthesis of branched chain amino acids were down regulated, two involved in their catabolism were up regulated. The two genes (*bkdA1*, *bkdA2*) encode the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 (alpha and beta subunits) involved in the production of 3-methyl butanoyl-CoA precursor of 3-methyl butanoic acid (Table 1). The catabolism of leucine has been characterized in *S. xylosus* and the pathway leading to the synthesis of 3-methyl butanoic acid, 3-methyl butanal and 3-methyl butanol was identified (Beck *et al.*, 2004). These compounds and more generally methyl aldehydes, methyl acids and methyl alcohols contribute to the flavor of fermented sausages (Berdague *et al.*, 1993; Sondergaard & Stahnke, 2002; Stahnke, 1995).

Finally, seven genes involved in the aspartate and glutamate metabolism were modulated in *S. xylosus* grown in meat model (Table 1). Concerning aspartate, two genes *panD* and SXYL_01558 were down regulated while *ansA* encoding L-asparaginase was upregulated. In

B. subtilis, *ans* operon, including *ansA* coding for asparaginase and *ansB* for aspartase, is repressed in presence of nitrogen such as NH₄ but induced by aspartate even in the presence of NH₄ (Sun & Setlow, 1993). The gene *asnA2* coding for L-asparaginase was found induced during the growth of *L. sakei* in a meat model and the *asnA2* mutant has a reduce growth in this model (Hufner *et al.*, 2007). Asparagine seemed to be a source of nitrogen for *L. sakei* (Hufner *et al.*, 2007). Concerning glutamate, in *S. xylosus*, the gene *murI* encoding a glutamate racemase was down regulated while three genes were up regulated with *gltX* encoding a glutamate-tRNA ligase involved in protein synthesis. The two others, *gabD* and SXYL_00107 encoding respectively succinate semi-aldehyde dehydrogenase and glutamine synthetase were highly upregulated (15-40 folds). Glutamate and glutamine serve as the major amino group donors for all nitrogen-containing compounds, as link to nitrogen and carbon metabolism (Feehily & Karatzas, 2013). Moreover glutamate serves as an osmoprotectant in some bacteria (Saum *et al.*, 2006). In *B. subtilis*, the operon *glnA* and *glnR* encodes the glutamine synthetase and its regulator (Gunka & Commichau, 2012). In *Halobacillus halophilus*, two genes *glnA1* and *glnA2* encoding a glutamine synthetase were identified, only the expression of *glnA2* was increased in presence of NaCl (Saum *et al.*, 2006). In *S. xylosus*, two clusters are identified, one including *glnA*, *glnR* with same genetic organization as in *H. halophilus* and *B. subtilis* and the other including *gabD* and SXYL_00107 not yet described. The up regulation of this last cluster could be linked to the osmotic stress generated by the presence of salt.

Response to mild osmotic stress generated by NaCl

S. xylosus has to adapt to the concentration of sodium chloride (0.47 M) in meat model compared to 0.017M in the medium used for the preparation of the inoculum. It has also to adapt to moderate acidification as the inoculum was grown at pH 7.0 before its inoculation in meat at pH 5.9 which remained quite stable up to 72h (pH 5.7).

Osmotolerance is one of the characteristic features of staphylococci. A primary response of *S. xylosus* to the presence of NaCl was the down regulation of *mscL*, encoding a large conductance mechanosensitive channel, to prevent solute efflux (Table 1). In *Enterococcus faecalis*, the down regulation of *mscL* in presence of NaCl went along with the accumulation of potassium (Solheim *et al.*, 2014). This was not observed in our conditions, but different mechanisms such as accumulation of osmoprotectants, extrusion of Na⁺, modification of cell envelope were could be implicated. Staphylococci can import osmoprotectants by several transport systems (Kuroda *et al.*, 2005). In our study, the cluster *opuC* (*opuABCD*, the gene *lcdH* upstream *opuC* and two genes (*cudA*, *cudT*) of the cluster *cud* were highly up-regulated (Table 1). The cluster *opuC* encodes a glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter, it has been identified as the only uptake route for L- carnitine in *B. subtilis* and in *Listeria monocytogenes* (Angelidis & Smith, 2003; Kappes & Bremer, 1998). L-carnitine is found in raw meats with levels varying from 6.5 to 87.7 mg/100g (Demarquoy *et al.*, 2004). In our study, L-carnitine could be imported via the *opuC* and catabolised by the L-carnitine dehydrogenase encoded by *lcdH* in glycine betaine (Uanschou *et al.*, 2005). In parallel in *S. xylosus*, the two genes *cudT* and *cudA* encoded, respectively, enzymes in the pathway for choline uptake and deshydrogenation to form the osmoprotectant glycine betaine (Rosenstein *et al.*, 1999). These genes were found transcriptionally regulated by elevated concentration of NaCl (Rosenstein *et al.*, 1999). Finally, the gene SXYL_00317 encoding D-serine D-alanine glycine transporter, three genes (*sdaA1*, *sdaAB1*, *glyA*) encoding enzymes involved in the synthesis of glycine and the gene *metK* encoding S-adenosyl-methionine that serves as methyl donor for synthesis of glycine betaine were up regulated in *S. xylosus* in the meat model (Table 1).

Two clusters *mnh* (*mnhA1* to *mnhG1*, *mnhA2* to *mnhG2*) encoding Na^+/H^+ antiporter systems were up regulated in *S. xylosus* grown in meat model (Table 1). In *S. aureus*, two *mnh* clusters are also present, Mnh exhibited $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter activity, but not K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} antiporter activity, and had alkaline pH optima, while Mnh2 did not (Swartz *et al.*, 2007). An *E. coli* Mnh transformant exhibited marked Na^+ resistance at up to 400 mM at pH 7.5 while Mnh2 transformant did not. These two Mrp systems supported high growth of the transformants in media without Na^+ at pHs 7.5 to 9.0 (Swartz *et al.*, 2007). In *S. aureus* an active Mrp system resulted in an increase of transcription of respiratory chain components such as the succinate dehydrogenase locus (*sdh*) (Swartz *et al.*, 2007). The Mnh antiport of *S. aureus* has been shown to be transmembrane electrical potential consuming that can be compensated by enhancing component of the respiratory chain. Same observation can be done in our study as *sdh* cluster was up regulated. Concomitantly all the genes involved in the synthesis of the multisubunit F_0F_1 -ATPase were over expressed by *S. xylosus* as mentioned above (Table 1). This ATPase links the production of ATP to the transmembrane proton motive force (PMF) and can either generate ATP at the expense of the PMF or generate a PMF using ATP produce by fermentative substrate level phosphorylation (Cotter & Hill, 2003). The PMF can expulse the protons, resulting from the activity of the two *S. xylosus* *mnh* antiporters, from the cytoplasm to maintain pH homeostasis. In *Bacillus pseudofirmus*, proton pumping by the F_0F_1 -ATPase generated a proton motrice force across the membrane that powered Mrp antiporter activity after addition of Na^+ (Morino *et al.*, 2014). The degree of D-alanylation varies depending on environmental conditions such as pH, temperature or salt (Neuhaus & Baddiley, 2003). In *S. aureus*, esterification decreased with increase in pH, temperature or salt (Neuhaus & Baddiley, 2003). In *S. aureus*, *dlt* expression was repressed in response to high concentrations of Na^+ (0.325 M NaCl) (Koprivnjak *et al.*, 2006). Inactivation of *dltC* in *Streptococcus mutans* resulted in the generation of an acid-sensitive strain that could not grow below pH 6.5 (Cotter & Hill, 2003). *S. xylosus* over expressed two genes (*dltB*, *dltD*) involved in D-alanylation (Table 1). This up-expression is the result of the meat acid environment and the salt concentration (0.47 M NaCl). The gene *vraS* was up regulated in *S. xylosus*. This gene is involved in a two component system VraSR in *S. aureus*, this is a positive regulator of the synthesis of peptidoglycane. The gene *vraS* encoding a kinase sensor was up regulated in *S. aureus* after an acid shock (Bore *et al.*, 2007; Kuroda *et al.*, 2003). Sigma factors have been demonstrated to play a role in the response of bacteria to environmental conditions. The expression of *rsbU* in *S. xylosus* was up regulated while those of *rsbV*, *rsbW* were down regulated (Table 1). These genes belonged to the *sigB* cluster including the gene *sigB* with the same genetic organization as the one of *S. aureus* and *S. epidermidis* (Knobloch *et al.*, 2001). In *S. epidermidis*, osmolarity increased the synthesis of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) and biofilm formation. The induction of PIA synthesis by NaCl depends on a functional *rsbU* gene (Knobloch *et al.*, 2001). Our results with the up regulation of only *rsbU* in *S. xylosus* in presence of salt could suggest a regulation independent of sigma B.

ACKNOWLEDGEMENTS

Aurore Vermassen is a PhD Research Fellow funded by the French ‘Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (M.E.N.E.S.R.)’. The microarray development was financially supported by the ANR project “Genoferment” ANR-05-PNRA-020. We would like to thank Jean-Paul Chacornac for valuable technical assistance with meat inoculation and sampling.

REFERENCES

- Angelidis, A. S. & Smith, G. M. (2003).** Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7492-7498.
- Aro Aro, J. M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K.-i., Fukushima, M. & Sekikawa, M. (2010).** The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry* **119**, 279-285.
- Barrière, C., Brückner, R. & Talon, R. (2001a).** Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4096-4104.
- Barrière, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Setrin, S., Berdague, J. L. & Talon, R. (2001b).** Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 181-185.
- Barrière, C., Brückner, R., Centeno, D. & Talon, R. (2002).** Characterisation of the *kata* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **216**, 277-283.
- Beck, H. C., Hansen, A. M. & Lauritsen, F. R. (2004).** Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 1185-1193.
- Berdague, J. L., Monteil, P., Montel, M. C. & Talon, R. (1993).** Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science* **35**, 275-287.
- Bore, E., Hebraud, M., Chafsey, I. & other authors (2007).** Adapted tolerance to benzalkonium chloride in *Escherichia coli* K-12 studied by transcriptome and proteome analyses. *Microbiology* **153**, 935-946.
- Brückner, R. & Titgemeyer, F. (2002).** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters* **209**, 141-148.
- Champomier-Vergès, M.-C., Marceau, A., Méra, T. & Zagorec, M. (2002).** The *pepR* gene of *Lactobacillus sakei* is positively regulated by anaerobiosis at the transcriptional level. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3873-3877.
- Coton, E., Desmonts, M.-H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christieans, S., Donnio, P.-Y., Lebert, I. & Talon, R. (2010).** Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* **137**, 221-229.
- Cotter, P. D. & Hill, C. (2003).** Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 429-453.
- Cretenet, M., Laroute, V., Ulve, V. & other authors (2011).** Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Appl Environ Microbiol* **77**, 247-257.
- Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.-C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S. & Le Borgne, F. o. (2004).** Radioisotopic determination of l-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chemistry* **86**, 137-142.

- Engelvin, G., Feron, G., Perrin, C., Molle, D. & Talon, R. (2000). Identification of beta-oxidation and thioesterase activities in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *FEMS Microbiology Letters* **190**, 115-120.
- Fadda, S., Lebert, A., Leroy-Setrin, S. & Talon, R. (2002). Decarboxylase activity involved in methyl ketone production by *Staphylococcus carnosus* 833, a strain used in sausage fermentation. *FEMS Microbiology Letters* **210**, 209-214.
- Fadda, S., Lopez, C. & Vignolo, G. (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science* **86**, 66-79.
- Feehily, C. & Karatzas, K. A. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology* **114**, 11-24.
- Fiegler, H. & Brückner, R. (1997). Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiology Letters* **148**, 181-187.
- Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I. & Bruckner, R. (1999). Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *Journal of Bacteriology* **181**, 4929-4936.
- Frunzke, J., Engels, V., Hasenbein, S., Gatgens, C. & Bott, M. (2008). Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Molecular Microbiology* **67**, 305-322.
- Fuchs, S., Pané-Farré, J., Kohler, C., Hecker, M. & Engelmann, S. (2007). Anaerobic Gene Expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **189**, 4275-4289.
- Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihashi, J. & Aratani, Y. (1986). Organization and transcription of the gluconate operon, gnt, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 13744-13753.
- Gunka, K. & Commichau, F. M. (2012). Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Molecular Microbiology* **85**, 213-224.
- Hufner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A. M., Zagorec, M. & Hertel, C. (2007). Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2522-2531.
- Hughes, M. C., Kerry, J. P., Arendt, E. K., Kenneally, P. M., McSweeney, P. L. & O'Neill, E. E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science* **62**, 205-216.
- Kappes, R. M. & Bremer, E. (1998). Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and gamma-butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* **144**, 83-90.
- Knobloch, J. K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H. & Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* **183**, 2624-2633.

- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A. & Weiss, J. P. (2006).** Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **188**, 3622-3630.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. & Hiramatsu, K. (2003).** Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **49**, 807-821.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H. & other authors (2005).** Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 13272-13277.
- Lafarga, T. & Hayes, M. (2014).** Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* **98**, 227-239.
- Leroy, F., Verluyten, J. & De Vuyst, L. (2006).** Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 270-285.
- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., Lebert, I. & Talon, R. (2010).** Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology* **27**, 294-301.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Majerczyk, C. D., Dunman, P. M., Luong, T. T., Lee, C. Y., Sadykov, M. R., Somerville, G. A., Bodi, K. & Sonenshein, A. L. (2010).** Direct targets of *CodY* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* **192**, 2861-2877.
- Morino, M., Suzuki, T., Ito, M. & Krulwich, T. A. (2014).** Purification and functional reconstitution of a seven-subunit *Mrp*-type Na^+/H^+ antiporter. *Journal of Bacteriology* **196**, 28-35.
- Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. (2003).** A continuum of anionic charge: structures and functions of *D*-alanine-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 686-723.
- Nuxoll, A. S., Halouska, S. M., Sadykov, M. R., Hanke, M. L., Bayles, K. W., Kielian, T., Powers, R. & Fey, P. D. (2012).** *CcpA* regulates arginine biosynthesis in *Staphylococcus aureus* through repression of proline catabolism. *PLOS Pathogens* **8**, 29.
- Pagels, M., Fuchs, S., Pane-Farre, J. & other authors (2010).** Redox sensing by a *Rex*-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **76**, 1142-1161.
- Planchon, S., Desvaux, M., Chafsey, I., Chambon, C., Leroy, S., Hébraud, M. & Talon, R. (2009).** Comparative subproteome analyses of planktonic and sessile *Staphylococcus xylosus* C2a: New insight in cell physiology of a coagulase-negative *Staphylococcus* in biofilm. *Journal of Proteome Research* **8**, 1797-1809.
- Ravyts, F., Vuyst, L. D. & Leroy, F. (2012).** Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences* **12**, 356-367.
- Reizer, J., Bergstedt, U., Galinier, A., Kuster, E., Saier, M. H., Jr., Hillen, W., Steinmetz, M. & Deutscher, J. (1996).** Catabolite repression resistance of *gnt* operon expression in *Bacillus subtilis*

conferred by mutation of His-15, the site of phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of the phosphocarrier protein HPr. *Journal of Bacteriology* **178**, 5480-5486.

Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D. & Gotz, F. (1999). The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A: genetic and physiological characterization. *Journal of Bacteriology* **181**, 2273-2278.

Sanz, Y. & Toldra, F. (2001). Purification and Characterization of an X-Prolyl-Dipeptidyl Peptidase from *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1815-1820.

Saum, S. H., Sydow, J. F., Palm, P., Pfeiffer, F., Oesterheld, D. & Muller, V. (2006). Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology* **188**, 6808-6815.

Shivers, R. P. & Sonenshein, A. L. (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Molecular Microbiology* **53**, 599-611.

Smith, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics Molecular Biology* **3**, Article3. Epub 2004 Feb 2012.

Solheim, M., La Rosa, S. L., Mathisen, T., Snipen, L. G., Nes, I. F. & Brede, D. A. (2014). Transcriptomic and Functional Analysis of NaCl-Induced Stress in *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* **9**, e94571.

Sondergaard, A. K. & Stahnke, L. H. (2002). Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*, a comparative study in model systems. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 99-109.

Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels -- Part II. Volatile components. *Meat Science* **41**, 193-209.

Stahnke, L. H. (1999). Volatiles Produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during Growth in Sausage Minces Part II. The Influence of Growth Parameters. *LWT - Food Science and Technology* **32**, 365-371.

Sun, D. & Setlow, P. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *ansR* gene, which encodes a repressor of the *ans* operon coding for L-asparaginase and L-aspartase. *Journal of Bacteriology* **175**, 2501-2506.

Swartz, T. H., Ito, M., Ohira, T., Natsui, S., Hicks, D. B. & Krulwich, T. A. (2007). Catalytic properties of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* members of the secondary cation/proton antiporter-3 (Mrp) family are revealed by an optimized assay in an *Escherichia coli* host. *Journal of Bacteriology* **189**, 3081-3090.

Talon, R. & Leroy, S. (2006). Latest developments in meat bacterial starters - Chapter 16. In *Advanced Technologies for Meat Processing* , pp. 401-418. Edited by L. M. L. Nollet & F. Toldra. New York: CRC Press, Taylor and Francis group.

Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L. & Martinussen, J. (2004). The pH-unrelated influence of salt, temperature and manganese on aroma formation by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* in a fermented meat model system. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 31-42.

Toldrá, F. (2008). Biochemistry of Meat and Fat. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, pp. 51-58: Blackwell Publishing Ltd.

Uanschou, C., Friht, R. & Pittner, F. (2005). What to learn from a comparative genomic sequence analysis of L-carnitine dehydrogenase. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **136**, 1365-1381.

Yoshida, K., Ohmori, H., Miwa, Y. & Fujita, Y. (1995). *Bacillus subtilis* gnt repressor mutants that diminish gluconate-binding ability. *Journal of Bacteriology* **177**, 4813-4816.

Zamboni, N., Fischer, E., Laudert, D., Aymerich, S., Hohmann, H. P. & Sauer, U. (2004). The *Bacillus subtilis* yqjI gene encodes the NADP⁺-dependent 6-P-gluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway. *Journal of Bacteriology* **186**, 4528-4534.

Figure 1: Genes differentially expressed by *Staphylococcus xylosus* grown in meat model *versus* the inoculum

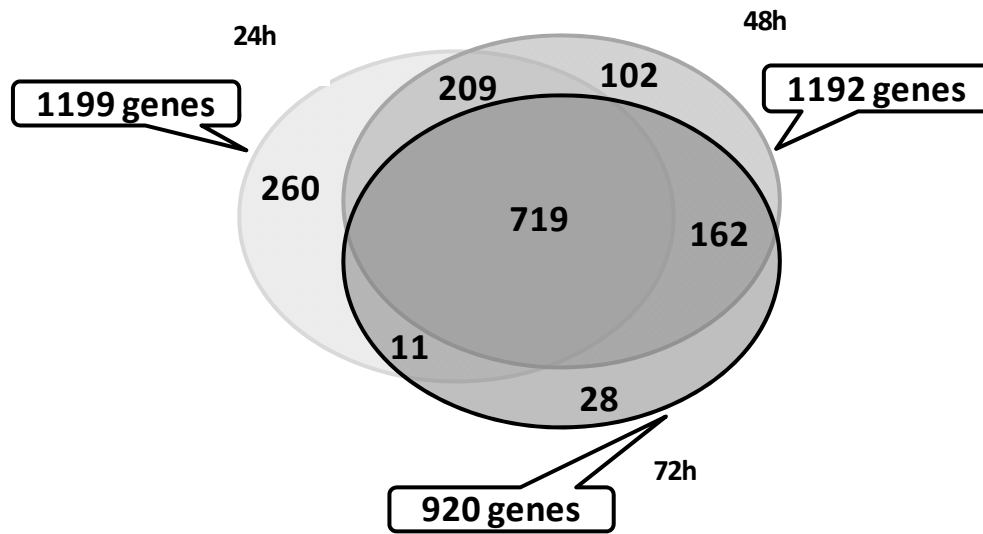


Figure 2: Comparison of log2 expression ratios of 47 differentially regulated genes measured by using microarray and qPCR at t_{24h} (A), t_{48h} (B) or t_{72h} (C). Positive and negative log2 expression ratios represent up- and down-regulation in meat model *versus* the inoculum. Each data point is calculated from averages of biological triplicates.

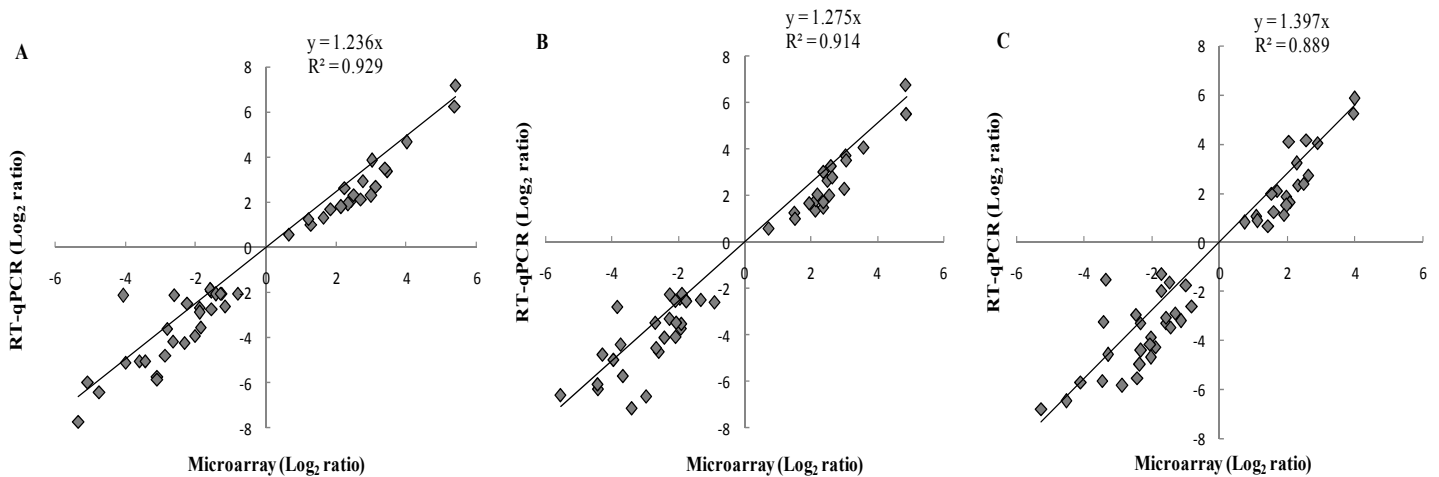
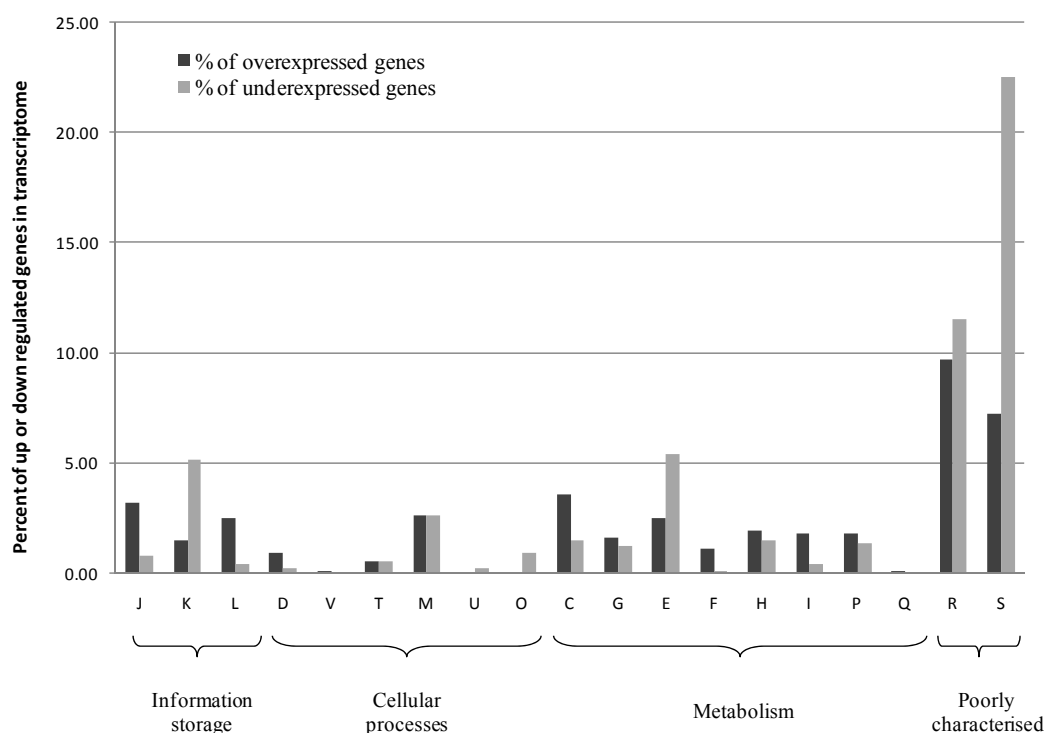


Figure 3: COG distribution of differentially up-and down-regulated genes in the transcriptome at t_{24h} , t_{48h} and t_{72h} in meat model *versus* inoculum. The percentages represent the number of genes that are in a category relative to the respective total number of genes that were up- or down-regulated. The COG abbreviations are as follows: [J] translation, ribosomal structure, and biogenesis; [K] transcription; [L] replication, recombination, and repair; [D] cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning; [M] cell wall/membrane/envelope biogenesis; [T] signal transduction mechanisms; [O] post-translational modification, protein turnover, and chaperones; [U] intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; [C] energy production and conversion; [E] amino acid transport and metabolism; [G] carbohydrate transport and metabolism; [F] nucleotide transport and metabolism; [H] coenzyme transport and metabolism; [I] lipid transport and metabolism; [P] inorganic ion transport and metabolism; [Q] secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism; [R] general function prediction only; [S] function unknown.



Supplementary Table 1. Targeted genes of *Staphylococcus xylosus* for the validation of microarray data by qPCR: expression at t24h, t48h or t72h in meat model compared to inoculum.

Gene			Sequences of primers pairs for qPCR (5'-3')			Ratio of expression at indicated time as determined by:					
						Microarray			qPCR		
						24h	48h	72h	24h	48h	72h
katC	TTCGATCATGAACGTATACCA	GTGTCTGGTGAACCTTTAGAG	0.16	0.21	0.20	0.06	0.10	0.05			
sfaB	GTCAATTGATACATGCAACGCTA	TCGTCAGATGTTAATGGAAGCT	0.14	0.17	0.20	0.04	0.04	0.03			
queC	GGCTATCGTAGTGTTTAGTGGT	ATGTTGTCTTCTTGCAATGCC	10.93	5.92	3.89	10.43	3.99	3.65			
pheT	TAACTGCTGCTGTAACGTAT	TGGCTCTACTTCACCAATGTC	5.39	4.43	2.71	4.22	2.54	1.57			
leuC	GCGACACTTGACCATAATGTG	CTGTTTCAGGTCCAAACCATGT	0.34	0.05	0.09	0.26	0.03	0.11			
metK	GTTGCTTGTGAGACGACAGTA	GCCATTGTCTGGCTATCGTA	6.76	8.33	4.81	7.66	13.09	9.31			
rplJ	TGGTCTAAAGCTGTGCTGA	GTAGCAACTGCAATAGGACC	8.75	4.47	4.17	6.53	3.45	3.12			
dltD	GGTACTGGTGGTTCGACAG	AACTGATTGAGCTGTGCCT	8.13	6.11	3.22	14.45	9.53	4.32			
proC	GTGCTGGAATATGGCACATG	ATTGACGCCTAACTCATCAGC	0.33	0.26	0.30	0.27	0.18	0.26			
gevT	GATGGGCTATGCCAGTCC	ACTGTGCAGCTCTCACTACC	0.27	0.29	0.50	0.16	0.18	0.30			
aroD	TCGAACGAAGACTCAAGGTG	TTGCGATGCGCTGATTCTA	0.25	0.27	0.33	0.07	0.08	0.10			
argC	AGGTAGTGGTTATGAGCGCAT	GCGTTAAGTGACTCAAGTGAG	0.42	0.27	0.37	0.24	0.09	0.09			
hutG	CTGGCACAACTGATCTTTG	TCAGGACCTTCTTTAGCACC	0.08	0.24	0.33	0.03	0.17	0.12			
nagA	GGACGCTTCATTTGAAGGATT	TCCCAACAATACTAGCTGCAT	2.45	2.85	2.13	2.01	2.37	2.05			
fruA	AGGAGGCTTCCAGGACAA	GTGGACCAGCGCATTAAAT	3.09	2.89	2.16	2.49	1.98	1.82			
folB	TTATCATGGCGCGTTACCA	GGCTTCCTTCCATAATCGC	8.01	8.10	3.94	4.92	4.84	2.82			
fabD	ATAGCTTAGGCGAGTATGCG	AACTTCCTCGTAATCCAAGCC	10.51	8.43	4.99	11.45	11.35	5.05			
panD	CATAGAGCGAGTGCAGCG	ACCCTACCTCGTTCCACTT	0.37	0.19	0.25	0.24	0.06	0.07			
ldh2	GGAAGAGTAGGTAGTCAAGTTTAAAC	CTAATAATGTACGATGCCATCATT	0.21	0.27	0.36	0.18	0.21	0.33			
glpD	GCACAAGGTACAAGTTCACG	AAGCATACGTTTCAGGTGTTGT	0.14	0.16	0.20	0.08	0.09	0.10			
SKYL_00055	TGATGGACACACACTTATCTAAGA	ACAAGTTTGGATCATCCTTAGAGTC	0.28	0.24	0.27	0.09	0.09	0.05			
ulaA	GGTAACACAATCACTCGAACATT	AAATGCTGCCATATAAAAGGTATGATG	3.60	12.11	7.44	3.24	16.63	16.51			
czaA	GGAAAGATTCAATTAAACGAACAAAG	TTGGTGAGAAACGTTAGATTGACT	0.27	0.05	0.04	0.14	0.01	0.01			
ribE	TGTTTACAGGAATTGTTGAAGAAATAGG	CTCTTTCTAAATTCACCTCAGCAGAT	0.34	0.30	0.40	0.15	0.17	0.13			
argG	TGTTTATGATACAAGTGTCCGA	TCATATGACACGAATCTTCAC	0.41	0.24	0.24	0.25	0.06	0.06			
mnhE1	CGTCACAGGCAGTTATACATTTAATAA	CGGCTCATTATCAATCTTTGGTTT	4.75	5.70	2.91	6.23	6.19	3.90			
sle1	GACTCATTGTGGTCAATAGCGA	TGAAGACGTGTTGGAACCTGA	5.68	5.22	6.09	4.97	2.78	6.64			
hisB	CGTAACACTGCTGAAACACAATT	GTGACGTGGTGATCGTCTAC	0.03	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01			
hisD	GTTCCAGCGCTTAAAGCATATAAT	TTGATAAGTTTCAATACGAGCATGAC	0.06	0.05	0.06	0.03	0.01	0.02			
hisG	GCGTTAGAACAGAGAGAACGT	GCCAAATGGTAAGTCCAGAAG	0.09	0.08	0.09	0.03	0.02	0.02			
trpD	CATTCTATGTATGATCAACAGCCTT	GTAATCTGTACTTCTCATGATGAC	0.45	0.40	0.46	0.16	0.18	0.11			
SKYL_00107	GGTAAGCGAATTACTGGAGACTT	CCGTCACGGAGTAACATCA	41.68	29.19	15.72	143.61	107.51	57.58			
gabD	ATGGTGAGCAAACTCAAAGTAAA	AAGCATTAGCAGCGCATCAA	41.29	29.52	15.40	75.80	45.22	38.22			
SKYL_00173	GGAAGTTGGATAGAGCCACAA	TTCTACACGATCCGCAATATCTAAT	0.04	0.06	0.10	0.01	0.03	0.04			
SKYL_02642	GAAGTAATATTCGATGCACATAGAGG	ACCTTCAGATTAGCTAGCTTT	0.12	0.09	0.14	0.02	0.01	0.02			
metE	TTACACAAGAGAACCTTATTACTCCAAA	ATATAGTGATAGTTGTGTTGAACCAAT	0.12	0.13	0.19	0.02	0.01	0.02			
SKYL_02645	ATTAGAACAAATTAATCATCAACGTGG	AGTACCATACTGACTTACAATATCCAA	0.20	0.16	0.24	0.05	0.04	0.04			
SKYL_00255	GACGTATGAAATGATAAGAATTGATG	TCATCAGCAAAATAAGGAAATGCTTT	0.03	0.08	0.18	0.00	0.05	0.13			
isdG	GATGATGAGCAAGATTACGACC	CAGGTGACTCTTCACTGTTAGA	0.16	0.21	0.30	0.23	0.21	0.41			
nikA	ATGAGCCGCTTTAGCTGTA	TCAAACCTCAGTACCATCGTGG	1.58	1.66	1.66	1.48	1.48	1.75			
SKYL_01544	AGTGTTAATGGTGACGATGATAC	TTGTTGTGAACTTTGTTCGCC	2.30	5.22	5.92	2.39	8.02	17.92			
narJ	GGAACGAGGGCAATTATTAGC	GGACTATTTTGTCTGCCAATTG	5.07	3.89	3.06	3.76	3.15	2.33			
narH	GGCAGGTGGTCATGTTACT	CACGACAAGCCTCTCTGATC	5.04	4.62	3.73	4.34	4.08	2.15			
pyrP	CACACCTTCGTTTCACTTGG	TGATACGCCATCACCGATG	16.15	6.30	4.14	25.23	6.83	17.27			
spxA	TCCGTATACGGAGCGTAACA	ACGACGTAAATAAACCGAGGTT	0.06	0.07	0.10	0.23	0.14	0.35			
hemG	AGAACGTTTGGGTGATGAGG	CTGGGTATAATTGACGCTGC	4.42	5.23	5.60	3.46	3.27	5.17			
SKYL_02548	GCATTAGAATTTGCCGCAATG	AGCAGCATCTACCACTTCG	0.58	0.54	0.57	0.25	0.16	0.16			

**COMPORTEMENT GLOBAL DE LA SOUCHE
STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS C2A DANS LA
VIANDE EN PRESENCE DE NITRATE ET DE
NITRITE**

Contexte de l'étude

Une des principales fonctions de *S. xylosus* dans les produits carnés transformés est de réduire le nitrate en nitrite qui est nécessaire au développement de la couleur. Dans ces produits, le nitrite est ensuite réduit par des réactions chimiques en monoxyde d'azote, ce dernier interagit avec l'hème de la myoglobine pour former la nitrosomyoglobine, un composé stable et rouge, responsable de la couleur typique des salaisons. Le contexte actuel vise à limiter voire supprimer l'utilisation de composés nitrosés dans les produits carnés par les industriels. Cependant, la réponse des ferments à ces additifs est méconnue.

Notre objectif a été de caractériser l'expression de *S. xylosus in situ* en matrice carnée en présence de nitrate et de nitrite aux concentrations utilisées dans l'industrie carnée.

Nous avons choisi de comparer l'expression des gènes de la souche *S. xylosus* C2a en matrice carnée avec et sans nitrates/nitrites, à 24 et 72 heures d'incubation, par une approche de transcriptomique globale via l'utilisation de la puce à ADN spécifique de cette espèce.

Résultats principaux de l'étude

➤ La croissance bactérienne est similaire dans les deux matrices en présence ou absence de composés nitrosés.

L'évolution de la couleur est différente dans la matrice carnée en présence de nitrate/nitrite. Dès 24 heures d'incubation, la matrice est de couleur rouge, témoignant de la formation de nitrosomyoglobine. Les dosages des nitrates/nitrites dans les matrices viandes ont montré qu'une grande partie du nitrate est réduit en nitrite dès 24 heures d'incubation. L'analyse transcriptomique a révélé que les gènes *nar* et *nir* ne sont pas différentiellement exprimés à 24 et 72 heures d'incubation en présence de composés nitrosés. Ce résultat n'est pas surprenant car la réduction du nitrate en nitrite est terminée à 24 heures de croissance.

➤ L'analyse statistique des résultats obtenus par l'approche de transcriptomique globale fait apparaître 627 gènes de *S. xylosus* dont l'expression est significativement différente en matrice carnée à 24 et/ou 72 heures d'incubation en présence de nitrate et de nitrite en comparaison à la matrice carnée témoin. Cela correspond à une modification de 24% des gènes de *S. xylosus*. A 24 heures d'incubation, 466 gènes sont différentiellement exprimés, à 72 heures d'incubation 241 gènes sont différentiellement exprimés. L'ensemble des données

brutes concernant les échantillons utilisés dans l'Article 2 ont été déposés sur le site NCBI GEO sur la plateforme GPL19201 créée précédemment et sont accessibles en ligne sous le nom de série GSE61514 (Annexe 2).

➤ Le nitrite dans un milieu complexe comme la viande et à pH acide subit diverses réactions chimiques qui conduisent à la formation d'espèces réactives de l'azote, incluant le monoxyde d'azote. *S. xylosus* répond à ce stress nitrosant, très similaire au stress oxydant, en mettant en œuvre différents mécanismes impliquant l'homéostasie du fer et sa régulation, la défense contre le stress oxydant et sa régulation et la réparation de l'ADN.

Homéostasie du fer : *S. xylosus* surexprime 17 gènes impliqués dans l'acquisition du fer. La plupart de ces gènes sont liés à la production ou à la reconnaissance des sidérophores (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*). Le gène *fntA* codant une ferritine impliquée dans le stockage du fer est également surexprimé. Ces gènes sont décrits sous la dépendance du régulateur Fur dont l'activité est dépendante du fer. Par analogie avec la séquence conservée répétée inverse de 19 pb de Fur chez *S. aureus*, nous avons identifié des Fur box en amont des gènes *htsA*, *sstA*, *fhuC*, *fhuD1*, *fhuD2* chez *S. xylosus*. Le NO peut moduler l'activité de Fur. Le nouveau complexe Fur-fer-NO formé ne peut plus se fixer à l'ADN et les gènes sous sa dépendance ne sont plus réprimés.

Défense contre le stress oxydant : *S. xylosus* surexprime 12 gènes impliqués dans les mécanismes de protection et de détoxification des espèces réactives de l'azote et de l'oxygène. Parmi ces gènes, trois codent des catalases: *kata* est sous exprimé alors que *katB*, *katC* sont surexprimés. De plus les gènes codant une alkyl hydroperoxide reductase (*ahpC*), une thioredoxine réductase (*trxB*), une bacterioferritine comigratory protein (*bcp*) et une glutathion peroxydase (*bsaA*) sont également surexprimés. Ces gènes sont sous la dépendance du régulateur PerR dont l'activité est dépendante du fer. Nous avons retrouvé une Per box en amont de chacun de ces gènes à l'exception de *kata*. Le complexe PerR-fer-NO ne peut plus se fixer sur l'ADN et les gènes sous sa dépendance ne sont plus réprimés.

Réparation de l'ADN et dégradation des protéines: *S. xylosus* surexprime des gènes comme *nrdI*, *nrdF*, *uvrC* et *nth* impliqués dans la réparation de l'ADN. Dans nos conditions, le stress nitrosant conduit aussi à une surexpression des gènes codant les chaperonnes HsIO, ClpC et GroS impliqués dans le turnover de protéines.

➤ Les espèces réactives de l'azote peuvent interagir avec de nombreuses cibles et ainsi altérer les enzymes contenant des groupements soufrés, des centres métalliques ou des résidus tyrosine. Ces altérations entraînent des modifications dans les concentrations en métabolites et dans le redox. *S. xylosus* doit s'adapter à ces changements en modulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des acides aminés.

Métabolisme des glucides : *S. xylosus* surexprime 9 gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des glucides. Quatre gènes codent des systèmes de transport et de phosphorylation (PTS) de glucides et cinq interviennent dans les voies d'EMP ou des pentoses phosphates. Ces gènes sont régulés par le régulateur catabolique CcpA.

Métabolisme des acides aminés : *S. xylosus* module 27 gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés. Neuf gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés ramifiés, cinq dans celui de la glycine/serine/thréonine et 13 dans celui des acides aminés aromatiques sont majoritairement sous exprimés. Alors que douze gènes impliqués dans la synthèse de l'arginine, l'urée et l'aspartate sont majoritairement surexprimés.

Article 2

Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylosus* in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress

Aurore Vermassen⁽¹⁾, Anne de La Foye⁽²⁾, Valentin Loux⁽³⁾, Régine Talon⁽¹⁾, Sabine Leroy⁽¹⁾

INRA, UR454 Microbiologie ⁽¹⁾, 63122 Saint-Genès Champanelle, France
INRA, Plateforme d'Exploration du Métabolisme ⁽²⁾, 63122 Saint-Genès Champanelle, France
INRA, UR1077 Mathématique, Informatique et Génome ⁽³⁾, 78350 Jouy-en-Josas, France

Publié dans *Frontiers in Microbiology*, Décembre 2014, 5:691



Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylosus* in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress

Aurore Vermassen¹, Anne de la Foye², Valentin Loux³, Régine Talon¹ and Sabine Leroy^{1*}

¹ Institut National de la Recherche Agronomique, UR454 Microbiologie, Saint-Genès-Champagnelle, France

² Institut National de la Recherche Agronomique, Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Saint-Genès-Champagnelle, France

³ Institut National de la Recherche Agronomique, UR1077 Mathématique, Informatique et Génome, Jouy-en-Josas, France

Edited by:

Biswarup Mukhopadhyay, Virginia Tech, USA

Reviewed by:

Yves Le Loir, Institut National de la Recherche Agronomique, France
Greg Somerville, University of Nebraska, USA

*Correspondence:

Sabine Leroy, Institut National de la Recherche Agronomique, UR454 Microbiologie, 63122 Saint-Genès-Champagnelle, France
e-mail: sabine.leroy@clermont.inra.fr

Staphylococcus xylosus is one of the major starter cultures used for meat fermentation because of its crucial role in the reduction of nitrate to nitrite which contributes to color and flavor development. Despite longstanding use of these additives, their impact on the physiology of *S. xylosus* has not yet been explored. We present the first *in situ* global gene expression profile of *S. xylosus* in meat supplemented with nitrate and nitrite at the levels used in the meat industry. More than 600 genes of *S. xylosus* were differentially expressed at 24 or 72 h of incubation. They represent more than 20% of the total genes and let us to suppose that addition of nitrate and nitrite to meat leads to a global change in gene expression. This profile revealed that *S. xylosus* is subject to nitrosative stress caused by reactive nitrogen species (RNS) generated from nitrate and nitrite. To overcome this stress, *S. xylosus* has developed several oxidative stress resistance mechanisms, such as modulation of the expression of several genes involved in iron homeostasis and in antioxidant defense. Most of which belong to the Fur and PerR regulons, respectively. *S. xylosus* has also counteracted this stress by developing DNA and protein repair. Furthermore, it has adapted its metabolic response—carbon and nitrogen metabolism, energy production and cell wall biogenesis—to the alterations produced by nitrosative stress.

Keywords: *Staphylococcus xylosus*, starter, nitrate, nitrite, transcriptome, nitrosative stress, meat

INTRODUCTION

Staphylococci are commensals of the skin and mucous membranes of animals and are found in various niches (Kloos et al., 1976; Nagase et al., 2002). Products of animal origin are naturally contaminated by staphylococci. *Staphylococcus xylosus* is one of the three species frequently isolated from cheeses and dry fermented sausages (Coton et al., 2010). Furthermore, *S. xylosus* is commonly used as starter culture in meat fermentation (Talon and Leroy, 2011). This bacterium contributes to the development of flavor through its antioxidant properties and degradation of amino acids (Barrière et al., 2001a,b, 2002; Talon et al., 2002). But its main function in cured products is to reduce nitrate to nitrite which is necessary for the development of color and flavor. In fermented meat products, nitrite is then reduced by chemical reactions to nitric oxide (NO), which interacts with myoglobin to form nitrosomyoglobin, which gives the meat a stable red color (Götterup et al., 2007). Nitrite is responsible for the production of the characteristic flavor of cured meat through complex mechanisms not entirely understood. Furthermore, nitrite and derived compounds act in meat as an antioxidant preventing lipid oxidation and therefore the development of rancid off-flavors (Cammack et al., 1999). Besides its role in color and flavor formation, nitrite preserves meat products against growth

of undesirable anaerobic bacteria and some pathogenic bacteria (Tompkin, 1995).

The reduction of nitrate and nitrite is well described in laboratory media for *Staphylococcus carnosus*, another meat starter culture (Neubauer and Götz, 1996). Compared with *S. carnosus*, the nitrate reductase activity of *S. xylosus* is poorly characterized and the nitrite reductase has not been described. Most strains of *S. xylosus*, like other meat-associated staphylococci, have a nitrate reductase activity (García-Varona et al., 2000; Mauriello et al., 2004).

Cured meat products have been manufactured using nitrate and nitrite since ancient times. In most countries, the use of nitrate and nitrite, usually added as potassium or sodium salts, is controlled in cured meat. Added or residual amounts are regulated by laws. A European parliament and council directive (directive 2006/52/EC) established limits of 150 mg nitrite/kg and 300 mg nitrate/kg for non-heated meat products. The limits on residual amounts are 50 mg nitrite/kg and 250 mg nitrate/kg in dried meat products (Honikel, 2008). Nitrate (after its conversion to nitrite) and nitrite have various valuable properties, but their safety is still questioned because of their contribution to the formation of carcinogenic nitrosamines. The current aim is to further restrict the use of nitrate and nitrite in meat products.

Functional starter cultures may be useful to reduce the levels of nitrate and nitrite as suggested by Leroy et al. (2006). However, the impact of these curing agents on the physiology of the starter cultures in meat is still unknown.

In this study, we characterized the transcriptomic effects of nitrate and nitrite at the levels used in the meat industry on the physiology of *S. xylosus* directly in a meat model, thereby establishing for the first time the *in situ* response to these additives. The transcriptome was analyzed in meat incubated in conditions that mimic the fermentation step in sausage manufacturing. The nitrosative stress generated by addition of nitrate and nitrite may trigger defense mechanisms developed by *S. xylosus*. One concerns modulation of the expression of several genes involved in iron homeostasis and the other concerns genes involved in antioxidant defense. Furthermore, this stress modifies the expression of several genes involved in carbon and nitrogen metabolism, energy production, cell wall biogenesis, and DNA and protein repair.

MATERIALS AND METHODS

BACTERIAL STRAIN AND CULTURE CONDITIONS

The *S. xylosus* C2a strain is derived from the type strain DSM20267 cured of its endogenous plasmid pSX267. We used this laboratory strain as it is the only one with some genetic background. Moreover, its complete genome has been sequenced (LN554884). The strain was cultured overnight at 30°C in a minimal medium (Fiegler and Brückner, 1997). The culture was centrifuged and the cell pellet was resuspended in physiological serum and used to inoculate the meat model with 10⁷ CFU/g of meat. To evaluate the inoculum and growth of *S. xylosus* in meat, bacteria were enumerated after serial dilutions on plates of brain-heart infusion agar (Difco Laboratories, Detroit, MI), which were incubated at 30°C for 24 h.

MEAT MODEL

Frozen vacuum-packed ground pork meat sterilized by irradiation (15 kGy) was used. After thawing the meat at 4°C, two batches were prepared. One batch with nitrate and nitrite was prepared as follows per kg of meat: 5 g of glucose, 27.7 g of NaCl, 0.18 g of KNO₃, 0.03 g of NaNO₂. The second batch was prepared as before but without nitrate and nitrite. After inoculation with *S. xylosus*, each batch was distributed in glass Petri dishes and incubated at 22°C in a wet atmosphere for up to 72 h. Three independent experiments were done.

ANALYTICAL METHODS

The samples were analyzed at 6 times of incubation (0, 2, 8, 24, 48, and 72 h): measurement of meat pH (pH meter MP230, Mettler Toledo/ sonde Inlab 413, Viroflay, France), evaluation of nitrate and nitrite concentrations in meat by reducing nitrate to nitrite with metallic cadmium and by addition of sulphanilamide chloride and N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride plus measurement of absorbance at 538 nm (NF V04-410), and visual evaluation of meat surface color.

TOTAL RNA EXTRACTION

At 24 and 72 h of incubation, several aliquots of 200 mg meat samples were taken from each batch of the three independent experiments and immediately frozen in liquid nitrogen to

stabilize the bacterial RNA. For RNA extraction, 1.25 mL of Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to the meat sample. The samples were transferred to tubes containing 800 mg of zirconia-silica beads (0.1 mm diameter) used to break the bacterial cells and were vigorously shaken in a bead beater (FastPrep, MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, France), after which 280 µL of chloroform was added. After centrifugation, the upper phase containing RNA was collected and a mixture of acid phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1) was added. After centrifugation, the upper phase was purified with the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's instructions. A supplementary treatment was performed with Turbo DNase (Ambion, Austin, TX) to remove all traces of contaminating DNA. The absence of *S. xylosus* genomic DNA contamination was verified by PCR targeting the *rpoB* gene. Total RNA isolated was quantified using a Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) and RNA quality was analyzed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions. The RNA was stored at −80°C.

RNA LABELING AND MICROARRAY

We have developed a DNA microarray specific to *S. xylosus* C2a based on an Agilent technology microarray. This array has 19,805 probes targeting the whole *S. xylosus* C2a genome. On average there are 6–10 probes per gene. A complete description of the array is available at the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database under platform accession number GPL19201.

RNA from each sample was reverse transcribed to cDNA with SuperScript Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The RNA-cDNA hybrids were then digested using RNase H (Invitrogen). The cDNA was labeled with Cy3 dCTP or Cy5 dCTP using the Bioprime DNA kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Unincorporated Cy-dye was removed using a CentriSep column (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom) and dye swap experiments were performed. Cy3/cDNA and Cy5/cDNA were mixed with Agilent hybridization buffer and hybridized at a temperature of 60°C for 17 h in a dedicated hybridization oven. After washing and drying, microarrays were scanned in a SYS-SN-ARRAY Agilent Microarray Scanner (5-µm resolution) with a coefficient of photomultiplication of 30%.

MICROARRAY DATA ANALYSIS AND STATISTICAL TREATMENT

Microarrays were analyzed by the Feature extraction software (Agilent, version 9.1.3.1) in 3 steps: localization of the spots, segmentation of the pixels and extraction of qualitative and quantitative data. These data were filtered to remove spots that were saturated or of poor quality. Within each array, Cy3/Cy5 log-ratios were normalized to correct for the mean spot intensity-dependent dye effect. Significant differences in the probe set intensities between the two conditions were identified using a linear model with an empirical Bayes method using all information probes to moderate the standard errors of the estimated log-fold changes (Smith, 2004). The probabilities were corrected by the Benjamini-Hochberg procedure in order to control the

false-discovery rate (FDR) with a p -value cut-off of 0.05. All the probes with an $\text{FDR} \leq 0.05$ are considered to be differentially expressed. Finally, one gene was considered to be differentially expressed if at least 66% of the corresponding probes were differentially expressed.

QUANTITATIVE PCR (qPCR)

qPCR was used to validate the microarray analysis and was performed using Real Plex Master Cyclo (Eppendorf, Hamburg, Germany) with IQTM SYBR[®]Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). Thermal cycling consisted of 30 s at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. The targeted genes and primer sequences are listed in Supplementary Table 1. All genes were quantified in duplicate for the three independent experiments. The analyses were performed on the same batches of RNA as those used for the microarray experiments. The housekeeping gene *rpoB* was used as reference gene for normalization. Results were calculated using the comparative cycle threshold method (Pfaffl, 2001).

MICROARRAY DATA ACCESSION NUMBER

The microarray samples and data have been deposited in the GEO database under accession number GSE61514.

RESULTS AND DISCUSSION

BEHAVIOR OF S. XYLOSUS IN THE MEAT MODEL

Bacterial growth was similar in the two batches of meat with or without nitrate and nitrite in the three independent replicates. Inoculated at 5×10^7 CFU/g, the growth of *S. xylosus* was exponential until t_{24h} when the population reached 9×10^8 CFU/g. It remained in the stationary phase until the end of the experiment (Supplementary Figure 1). These results differ from those of Neubauer and Götz (1996) showing that nitrate and nitrite promote the growth of *S. carnosus*. However, Neubauer and Götz's experimental conditions differed greatly from ours: *in vitro* in laboratory media vs. *in situ* in our meat model, and nitrate (25 mM) and nitrite (2 mM) concentrations that were very high compared with the 0.18 mM and 0.09 mM, respectively, we used.

The pH was measured at each point between t_{0h} and t_{72h} . As expected, only a weak acidification was observed in the meat model. The pH values were near 5.9 at t_{0h} and near 5.7 at t_{72h} . Addition of nitrate and nitrite had no effect on acidification in the meat. In our experiments, pH was less acid than in fermentation carried out in the presence of lactic acid bacteria, in which the pH can range from 4.5 to 5.3 (Demeyer et al., 2000).

Nitrate and nitrite were not detected in the batch prepared without nitrate and nitrite, whereas the initial concentrations of nitrate (180 mg/kg of meat) and nitrite (30 mg/kg of meat) added to the meat model were found at t_{0h} . Nitrate concentration decreased to 31 mg/kg of meat until t_{24h} and remained at 25 mg/kg until t_{72h} . Concomitantly, the nitrite concentration rose to 133 mg/kg of meat at t_{24h} and then decreased slowly to 92 mg/kg of meat at t_{72h} .

In parallel, a sharp color difference was observed between the two batches. In the presence of nitrate and nitrite at t_{72h} ,

the meat was red because of the formation of nitrosylmyoglobin (MbFeII·NO), while the meat in the other batch was brown due to the production of metmyoglobin (data not shown). In meat, the nitrite undergoes chemical reactions that lead to reactive nitrogen species (RNS), including NO (Honikel, 2008; Hammes, 2012). These RNS as well as reactive oxygen species (ROS) can interact with and damage numerous targets, including thiols, metal centers, tyrosine residues, nucleotide bases and lipids (Gaupp et al., 2012).

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS AND VALIDATION

A total of 627 genes were differentially expressed at t_{24h} and t_{72h} in the presence of nitrate and nitrite *in situ* in meat. This represented close to 24% of the 2634 total predicted genes in strain C2a. There were 466 genes at t_{24h} with 222 up- and 244 down-regulated and 241 genes at t_{72h} with 112 up- and 129 down-regulated. Only 80 common genes were differentially expressed at the two times of incubation. All the genes that passed our selection criteria are listed in Supplementary Table 2.

To validate the microarray analysis independently, the relative expression of 38 differentially expressed genes representing 6% of genes with significantly modified expression was measured by qPCR. The microarray and qPCR results for the tested genes were strongly correlated at 24 h ($r^2 = 0.806$; slope = 1.061) and 72 h ($r^2 = 0.848$; slope = 0.886) and the expected trend in the expression pattern was confirmed (Figure 1).

COG DISTRIBUTION IN THE TRANSCRIPTOME

The COG distribution of genes up- or down-regulated in response to RNS generated from nitrate and nitrite is shown in Figure 2. The most represented groups are genes involved in information storage and processing, cellular processes and metabolism. Many of the differentially regulated genes are unclassified or belong to the category "function unknown" [S] or "general function prediction only" [R]. At t_{24h} , for the up-regulated genes, the most-well represented categories were transcription [K], post-translational modification, protein turnover, and chaperones [O], amino acid transport and metabolism [E], carbohydrate transport and metabolism [G], inorganic ion transport and metabolism [P]. For the down-regulated genes, the 4 dominant categories were cell wall/membrane/envelope biogenesis [M], energy production and conversion [C], amino acid transport and metabolism [E] and translation, ribosomal structure, and biogenesis [J]. We observed a similar distribution for up- and down-regulated genes at t_{72h} .

EXPRESSION OF *nar* AND *nir* GENES

As in fermented meat products, in our experiment nitrate was reduced to nitrite by *S. xylosus*. The organization of *nar* and *nir* loci in the *S. xylosus* C2a genome is the same as in *S. carnosus*. No differential expression of *nar* and *nir* genes was noted between the two batches, i.e., with or without nitrate and nitrite at t_{24h} and t_{72h} . This is not surprising, at least for *nar* expression, as the reduction of nitrate to nitrite was mostly achieved at t_{24h} , as revealed by the assays of nitrate and nitrite during the incubation. Furthermore, the nitrate reductase activity of *S. xylosus* peaked during exponential growth in laboratory media supplemented

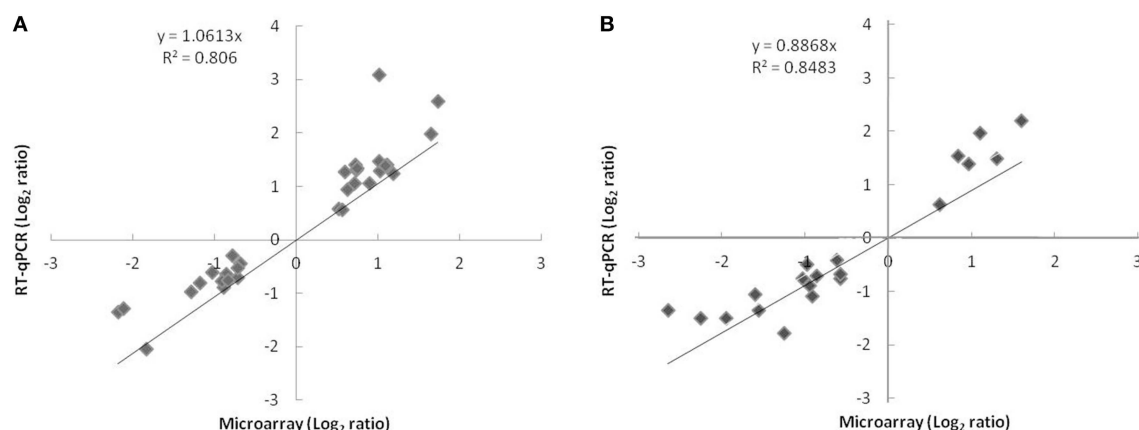


FIGURE 1 | Comparison of log₂ expression ratios of 38 differentially regulated genes measured by using microarray and qPCR at t_{24h} (A) or t_{72h} (B). Positive and negative log₂ expression ratios

represent up- and down-regulation in the presence of nitrate and nitrite. Each data point is calculated from averages of biological triplicates.

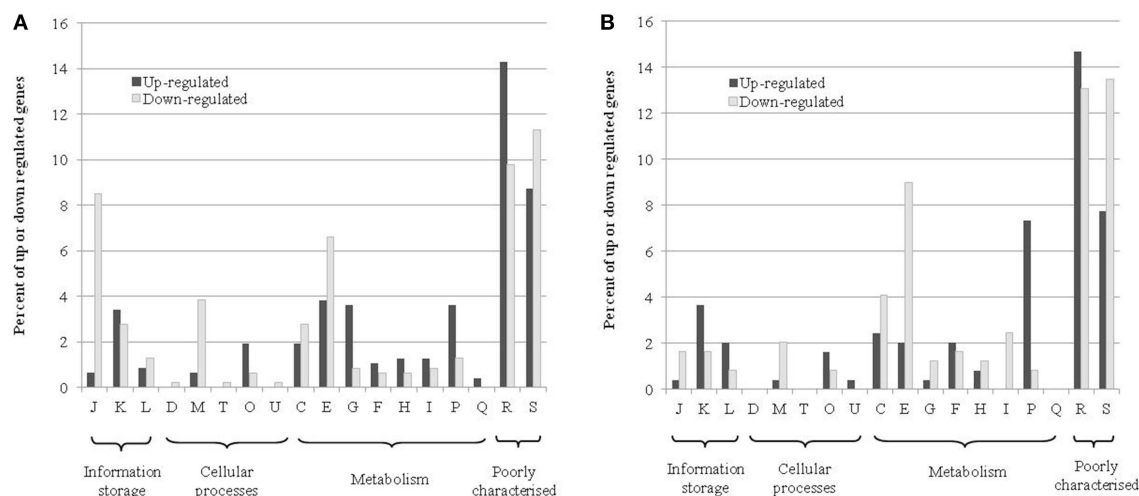


FIGURE 2 | COG distribution of differentially up- and down-regulated genes in the transcriptome at t_{24h} (A) or t_{72h} (B). The percentages represent the number of genes that are in a category relative to the respective total number of genes that were up- or down-regulated. The COG abbreviations are as follows: [J] translation, ribosomal structure, and biogenesis; [K] transcription; [L] replication, recombination, and repair; [D] cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning; [M] cell wall/membrane/envelope biogenesis; [T] signal transduction mechanisms; [O]

post-translational modification, protein turnover, and chaperones; [U] intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; [C] energy production and conversion; [E] amino acid transport and metabolism; [G] carbohydrate transport and metabolism; [F] nucleotide transport and metabolism; [H] coenzyme transport and metabolism; [I] lipid transport and metabolism; [P] inorganic ion transport and metabolism; [Q] secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism; [R] general function prediction only; [S] function unknown.

with nitrate (Talon et al., 1999). The nitrite can modulate the transcription of the *nir* operon during anaerobic and aerobic growth of *S. carnosus* (Neubauer et al., 1999). But in this *in vitro* study, 2 mM nitrite was used to enhance the transcriptional level. In our conditions, the maximum concentration of nitrite measured was 0.4 mM. In *S. carnosus*, the transcription of the *nar* and *nir* operons is under the control of NreBC, which regulates anaerobic respiration (Fedtke et al., 2002). In our meat model, with or without nitrate and nitrite, *S. xylosus* is subject to the same oxygen conditions, which could explain the non-differential expression of *nar* and *nir* genes.

IRON HOMEOSTASIS AND THE FUR REGULON

In meat, *S. xylosus* responded to the presence of RNS by the up-regulation of 17 genes involved in iron acquisition (Table 1). Most of these genes were related to the production or harnessing of siderophores (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*). Two siderophores may be produced by staphylococci: staphyloferrin A (SA) and staphyloferrin B (SB) (Beasley and Heinrichs, 2010; Sheldon and Heinrichs, 2012; Saha et al., 2013). In our study, only the genes *sfaABCD* with genetic organization similar to that of *Staphylococcus aureus* encoding enzymes for the synthesis of SA were identified (Hammer and Skaar, 2011). Adjacent to this

Table 1 | Genes of *Staphylococcus xylosus* discussed in this study differentially expressed over time in meat in the presence of nitrate and nitrite.

Functional category and family	Gene ID	Gene name	Protein	Mean ratio of expression		
				24 h	72 h	
P: INORGANIC ION TRANSPORT AND METABOLISM						
Iron	SXYL_02116	<i>sstA</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein SstA	2.8	3.3	
	SXYL_02115	<i>sstB</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein SstB	3.1	5.3	
	SXYL_02114	<i>sstC</i>	Iron compound ABC transporter, ATP-binding protein SstC	2.5	3.9	
	SXYL_02113	<i>sstD</i>	Lipoprotein SstD	2.5	3.8	
	SXYL_02202	<i>fhuB</i>	ABC-type cobalamin Fe ³⁺ -siderophores transport system permease component	2.6	1.8	
	SXYL_02203	<i>fhuC</i>	ABC-type cobalamin Fe ³⁺ -siderophores transport system ATPase component	2.7		
	SXYL_02201	<i>fhuG</i>	ABC-type cobalamin/Fe ³⁺ -siderophores transport systems, permease components	2.2	1.8	
	SXYL_00667	<i>fhuD1</i>	Iron ⁽³⁺⁾ -hydroxamate-binding protein	2.3	1.8	
	SXYL_02681	<i>fhuD2</i>	Iron ⁽³⁺⁾ -hydroxamate-binding protein	2.0	1.8	
	SXYL_00748	<i>sfaA</i>	Transporter SfaA	1.9	1.6	
	SXYL_00749	<i>sfaB</i>	Siderophore biosynthesis protein, lucA/lucC family	1.7	1.4	
	SXYL_00750	<i>sfaC</i>	amino acid racemase	1.5	1.3	
	SXYL_00747	<i>sfaD</i>	Siderophore biosynthesis protein, lucA/lucC family	2.4	2.0	
	SXYL_00751	<i>htsA</i>	Iron compound ABC transporter, iron compound-binding protein	3.1	2.5	
	SXYL_00752	<i>htsB</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein	1.7	2.0	
	SXYL_00753	<i>htsC</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein	1.7	1.9	
	SXYL_00755	<i>isdG</i>	Heme-degrading monooxygenase	2.0		
	Manganese	SXYL_00944	<i>ftnA</i>	Ferritin	1.6	
Manganese	SXYL_01831	<i>mntH</i>	Divalent metal cation transporter MntH	1.5	2.3	
Magnesium	SXYL_01923	<i>mgtE</i>	Divalent cation transporter MgtE	0.7		
O: POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION, PROTEIN TURNOVER, CHAPERONES						
Antioxidant defenses	SXYL_02505	<i>katA</i>	Catalase A	0.3	0.6	
	SXYL_01551	<i>katB</i>	Catalase B	2.3		
	SXYL_02533	<i>katC</i>	Catalase C	2.3		
	SXYL_02534	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C		2.0	
	SXYL_02083	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	1.6		
	SXYL_00973	<i>bcp</i>	Bacterioferritin comigratory protein	2.0		
	SXYL_01572	<i>bsaA</i>	Glutathione peroxidase	2.2		
	SXYL_00570		Ferredoxin–NADP reductase	2.4	1.9	
	SXYL_00895		Nitroreductase family protein		1.8	
	SXYL_02021		Nitroreductase family protein	2.1		
	SXYL_00410		Putative NAD(P)H nitroreductase	1.9		
	SXYL_01517	<i>msrA1</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA 1	1.5		
	Chaperones	SXYL_00898	<i>groS</i>	10 kDa chaperonin		2.0
		SXYL_02418	<i>hslO</i>	33 kDa chaperonin	1.9	
SXYL_02396		<i>clpC</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC		2.1	
G: CARBOHYDRATE TRANSPORT AND METABOLISM						
	SXYL_02255		Phosphotransferase system (PTS) maltose-specific enzyme IICB component	2.3		
	SXYL_00253		PTS system, glucose-specific IIBC component	0.5		
	SXYL_00278		PTS system, fructose-specific IIBC components	3.4		
	SXYL_00626		PTS system arbutin-like IIBC component	1.5		
	SXYL_01351	<i>malA</i>	Alpha-D-1,4-glucosidase	1.9		
	SXYL_01960	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	2.2		
	SXYL_00426	<i>fbp</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	1.8		

(Continued)

Table 1 | Continued

Functional category and family	Gene ID	Gene name	Protein	Mean ratio of expression	
				24 h	72 h
	SXYL_00039	<i>iolJ</i>	Fructose-bisphosphate aldolase, class II		1.9
	SXYL_00221	<i>fda</i>	Fructose-bisphosphate aldolase class 1	2.5	
	SXYL_01518	<i>rbsB</i>	Ribose ABC transporter substrate-binding protein	2.2	
	SXYL_01519	<i>rbsC</i>	Ribose ABC transporter permease	2.3	
	SXYL_01521	<i>rbsD</i>	D-ribose pyranase	2.1	
	SXYL_00125	<i>araA</i>	L-arabinose isomerase		0.4
	SXYL_00124	<i>araD</i>	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase		0.4
	SXYL_00126	<i>araT</i>	Arabinose-proton symporter		0.6
	SXYL_00607	<i>araB1</i>	Ribulokinase	2.0	
	SXYL_02331	<i>araB2</i>	Ribulokinase		0.5
E: AMINO ACID TRANSPORT AND METABOLISM					
Valine, leucine, isoleucine	SXYL_02474	<i>brnQ1</i>	Branched-chain amino acid transport system II carrier protein	0.3	0.5
	SXYL_00871	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	0.2	0.2
	SXYL_00870	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	0.2	0.2
	SXYL_00869	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	0.2	0.2
	SXYL_00868	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	0.2	0.3
	SXYL_00867	<i>ilvA</i>	L-threonine dehydratase biosynthetic IIvA	0.3	0.3
	SXYL_00874	<i>ilvB</i>	Acetolactate synthase	0.3	0.2
	SXYL_00872	<i>ilvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	0.2	0.2
	SXYL_00875	<i>ilvD1</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	0.3	0.2
Glycine, serine, threonine	SXYL_01317	<i>gcvT</i>	Aminomethyltransferase	3.5	
	SXYL_01318	<i>gcvPA</i>	Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 1	3.6	
	SXYL_01319	<i>gcvPB</i>	Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 2	3.0	
	SXYL_02528	<i>sdaAA1</i>	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit	0.6	
	SXYL_02529	<i>sdaAB1</i>	L-serine dehydratase subunit beta	0.5	
Methionine	SXYL_00012		Homoserine O-acetyltransferase		0.5
Tryptophan, phenylalanine, tyrosine	SXYL_01497	<i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain	0.6	0.5
	SXYL_01498	<i>trpB</i>	Tryptophan synthase beta chain		0.4
	SXYL_01500	<i>trpC</i>	Indole-3-glycerol phosphate synthase	0.6	0.4
	SXYL_01501	<i>trpD</i>	Anthranilate phosphoribosyltransferase	0.5	0.4
	SXYL_01502	<i>trpG</i>	Anthranilate synthase component II	0.5	0.4
	SXYL_01503	<i>trpE</i>	Anthranilate synthase component I	0.5	0.4
	SXYL_01128		DAHP synthetase-chorismate mutase		0.5
	SXYL_01513	<i>tyrA</i>	Prephenate dehydrogenase		3.1
	SXYL_00922	<i>pheA</i>	Prephenate dehydratase		0.6
	SXYL_02022	<i>aroD</i>	3-dehydroquinate dehydratase	1.7	
	SXYL_01261	<i>aroE</i>	Shikimate dehydrogenase	0.6	
	SXYL_01316	<i>aroK</i>	Shikimate kinase		0.5
Urea, arginine, aspartate	SXYL_00296	<i>ureA</i>	Urease gamma subunit	3.1	
	SXYL_00294	<i>ureC</i>	Urease subunit alpha	3.3	
	SXYL_00290	<i>ureD</i>	Urease accessory protein UreD	3.0	
	SXYL_00291	<i>ureG</i>	Urease accessory protein UreG	3.0	
	SXYL_00293	<i>ureE</i>	Urease accessory protein ureE	2.6	
	SXYL_00292	<i>ureF</i>	Urease accessory protein UreF	2.7	
	SXYL_00238	<i>rocD1</i>	Ornithine aminotransferase 1	0.6	
	SXYL_00241	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	0.6	
	SXYL_00239	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	0.6	
	SXYL_02450		Arginine/lysine/ornithine decarboxylase	0.7	

(Continued)

Table 1 | Continued

Functional category and family	Gene ID	Gene name	Protein	Mean ratio of expression	
				24 h	72 h
Peptidase	SXYL_01961	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase		1.6
	SXYL_01373	<i>asnA</i>	L-asparaginase	1.9	
	SXYL_01980	<i>ampA</i>	Cytosol aminopeptidase	1.9	
	SXYL_01931		Oligoendopeptidase F	1.7	
	SXYL_01348		Peptidase T-like protein	1.6	
Glycine, betaine, carnitine, choline	SXYL_00377	<i>dapE</i>	Probable succinyl-diaminopimelate desuccinylase	2.3	
	SXYL_00488	<i>opuCA</i>	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	0.3	
	SXYL_00489	<i>opuCB</i>	ABC-type proline glycine betaine transport system permease component	0.3	
	SXYL_00490	<i>opuCC</i>	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter opuCC	0.3	1.8
	SXYL_00491	<i>opuCD</i>	ABC-type proline glycine betaine transport system permease component	0.3	2.0
	SXYL_01535	<i>opuD1</i>	Glycine betaine transporter	0.5	0.5
C: ENERGY PRODUCTION AND CONVERSION					
Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ antiporter	SXYL_00830	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta	0.7	
	SXYL_01976	<i>mnhG1</i>	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ antiporter subunit G1		1.4
	SXYL_02226	<i>mnhA2</i>	Putative antiporter subunit A2	0.6	1.3
	SXYL_02223	<i>mnhD2</i>	Putative antiporter subunit D2	0.5	
	SXYL_02222	<i>mnhE2</i>	Putative antiporter subunit E2	0.5	
	SXYL_02221	<i>mnhF2</i>	Putative antiporter subunit F2	0.5	
	SXYL_02220	<i>mnhG2</i>	Putative antiporter subunit G2	0.6	
	SXYL_00623		Putative Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ antiporter	0.5	0.3
	SXYL_00425		Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ exchanger	0.6	
	SXYL_00363	<i>nhaC</i>	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ antiporter NhaC	2.0	2.2
M: CELL WALL/MEMBRANE BIOGENESIS					
	SXYL_01990	<i>dltA</i>	D-alanine—poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	0.3	0.7
	SXYL_01989	<i>dltB</i>	D-alanyl transfer protein DltB	0.3	0.7
	SXYL_01988	<i>dltC</i>	D-alanine—poly(phosphoribitol) ligase subunit 2	0.2	
	SXYL_01987	<i>dltD</i>	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD	0.2	0.7
F: NUCLEOTIDE TRANSPORT AND METABOLISM					
	SXYL_02117	<i>nrdF</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	1.7	3.7
	SXYL_02119	<i>nrdI</i>	Protein NrdI	1.6	3.1
	SXYL_00150	<i>nrdG</i>	Anaerobic ribonucleotide reductase activating protein		0.3
H: COENZYME TRANSPORT AND METABOLISM					
	SXYL_02415	<i>folB</i>	Dihydroneopterin aldolase	1.7	1.3
	SXYL_01872	<i>folD</i>	Bifunctional protein FolD	2.4	1.4
	SXYL_02414	<i>folK</i>	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridine pyrophosphokinase	1.4	
	SXYL_02416	<i>folP</i>	Dihydropteroate synthase	1.7	
L: REPLICATION, RECOMBINATION AND REPAIR					
	SXYL_01397	<i>nth</i>	Endonuclease III	1.4	
	SXYL_01796	<i>uvrC</i>	UvrABC system protein C	1.8	1.4
K: TRANSCRIPTION, REGULATORS					
	SXYL_00975	<i>perR</i>	Peroxide-responsive repressor PerR	2.0	
	SXYL_00784	<i>czrA</i>	Zinc and cobalt transport repressor CzcA		2.1
	SXYL_01275	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor HrcA	0.7	
	SXYL_01250	<i>greA</i>	Transcription elongation factor GreA		0.5
	SXYL_01657	<i>fapR</i>	Transcription factor FapR	0.6	0.7
	SXYL_01129	<i>ccpA</i>	Catabolite control protein A	1.8	

locus, also as described in *S. aureus*, a cluster of 3 genes *htsABC* encodes the ABC transporter for uptake of Fe-SA. The *hts-sfa* locus is found in all staphylococcal genomes, while the locus encoding SB is only found in *S. aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* (Sheldon and Heinrichs, 2012). In parallel, we confirmed by a chrome azurol S assay that the *S. xyloso* strain C2a incubated in Staphylococcal Siderophore Detection medium (Schwyn and Neilands, 1987) produced siderophores (data not shown). Staphylococci have not been shown to synthesize hydroxamate and catechol siderophores, but they are known to be able to utilize them as iron sources (Sheldon and Heinrichs, 2012). *S. xyloso* possesses both the Fhu system involved in the uptake of hydroxamate- and the Sst system for the catechol-type siderophores. As for *S. aureus*, a cluster of three genes *fhuCBG* encodes a dimeric permease (FhuBG) and an ATPase (FhuC) and two separate genes (*fhuD1*, *fhuD2*) encode substrate-binding lipoproteins. FhuC serves also as an ATPase for the import of Fe-SA (Sheldon and Heinrichs, 2012). Finally, a cluster of four genes *sstABCD* encodes an ABC transporter and SstD, which binds ferrated catechol siderophores and catecholamines, but also a broader range of potential substrates. This locus is highly conserved in *S. aureus* strains and is present in most coagulase-negative staphylococci (Sheldon and Heinrichs, 2012). The single gene *isdG* encoding a cytoplasmic heme-degrading monooxygenase was up-regulated in *S. xyloso* in the presence of RNS. In *S. aureus*, this gene belongs to the operon *isdCDEFsrtBisdG* which, together with four other operons, encodes the Isd system involved in heme-mediated iron acquisition (Hammer and Skaar, 2011). Unlike *S. aureus*, *S. xyloso* does not possess the other genes of the Isd system. Heme is used as a cofactor in many biological systems due to the redox potential of the iron atom, but at high levels this molecule can be toxic. IsdG could be used to regulate endogenous heme synthesis and metabolism (Haley and Skaar, 2012). Degradation of heme by IsdG releases iron, carbon monoxide and oxo-bilirubin, which has potent antioxidant properties (Haley and Skaar, 2012). IsdG has been found in many classes of bacteria, which underlines the importance of heme degradation. Despite the role of heme as cofactor and as iron and bilirubin sources, heme homeostasis is not yet understood (Haley and Skaar, 2012).

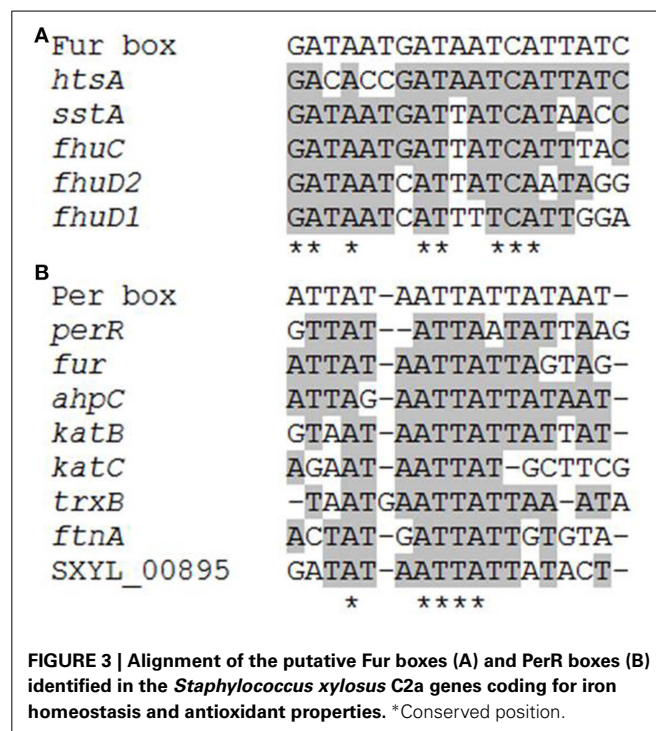
Concomitant with up-regulation of genes involved in iron acquisition, a gene involved in iron storage, *fntA* which encodes ferritin, was up-regulated in *S. xyloso* in the presence of RNS (Table 1). Ferritins are ubiquitous iron-storage proteins which can also protect against metal toxicity and oxidative stress (Andrews, 1998). They have been well-characterized in *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (Horsburgh et al., 2001a; Morrissey et al., 2004).

Iron is an essential nutrient, but as high levels of free intracellular ferric iron are toxic to cells, the amount of free iron has to be strictly regulated. In many bacteria, the ferric uptake regulator (Fur) functions as a transcriptional repressor for iron homeostasis. When complexed with iron, Fur regulates the transcription of genes by binding a consensus sequence known as the Fur box within the promoter region (Morrissey et al., 2004; Sheldon and Heinrichs, 2012). Genes involved in iron acquisition are repressed by Fur and thus Fur boxes controlling the expression of these genes in *S. aureus* have been described (Sheldon and Heinrichs,

2012). We have looked for Fur boxes in *S. xyloso* genes coding for iron acquisition by using the inverted repeat sequence of 19-bp described for *S. aureus*. We found putative sequences located close to a 35 bp site within the promoter region for *htsA*, *sstA*, *fhuC*, *fhuD1*, *fhuD2* with nucleotide identity to the *S. aureus* Fur box consensus sequence (Figure 3). Fur protein functions as a repressor. Under iron-replete conditions, Fe²⁺ binds to Fur and the Fur-Fe²⁺ homodimer binds to the Fur box sequence and inhibits the transcription (Hassan and Troxell, 2013). With iron deprivation, there is an increase in the transcription of genes involved in iron uptake. In meat, a lot of iron sources are available: ferritin, myoglobin, transferrin, and hemoglobin, which raises the question of why *S. xyloso* senses an iron deficiency environment in the presence of RNS. Fur can sense not only iron but also an oxidative environment (Fillat, 2014). It has been demonstrated that NO and peroxide can modulate Fur activity (Spiro, 2007). The direct interaction of NO with iron center of Fur leads to the inhibition of Fur activity resulting in the induction of iron-regulated genes by NO in *E. coli* (D'Aur  aux et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2004). NO can react with iron in Fur-Fe and abolish DNA binding and thus induce genes repressed by Fe-Fur in *S. aureus* (Richardson et al., 2006). Thus, we hypothesized that NO from nitrite can inactivate Fur, thus derepressing the regulon, and consequently genes involved in iron intake are up-regulated in *S. xyloso* (Figure 4).

ANTIOXIDANT DEFENSES AND THE PerR REGULON

The nitrosative stress can be augmented by intracellular iron, which can react with H₂O₂ by Fenton chemistry giving rise to damaging hydroxyl radicals (HO[•]). *S. xyloso* responded to this stress by the regulation of 12 genes involved in protection



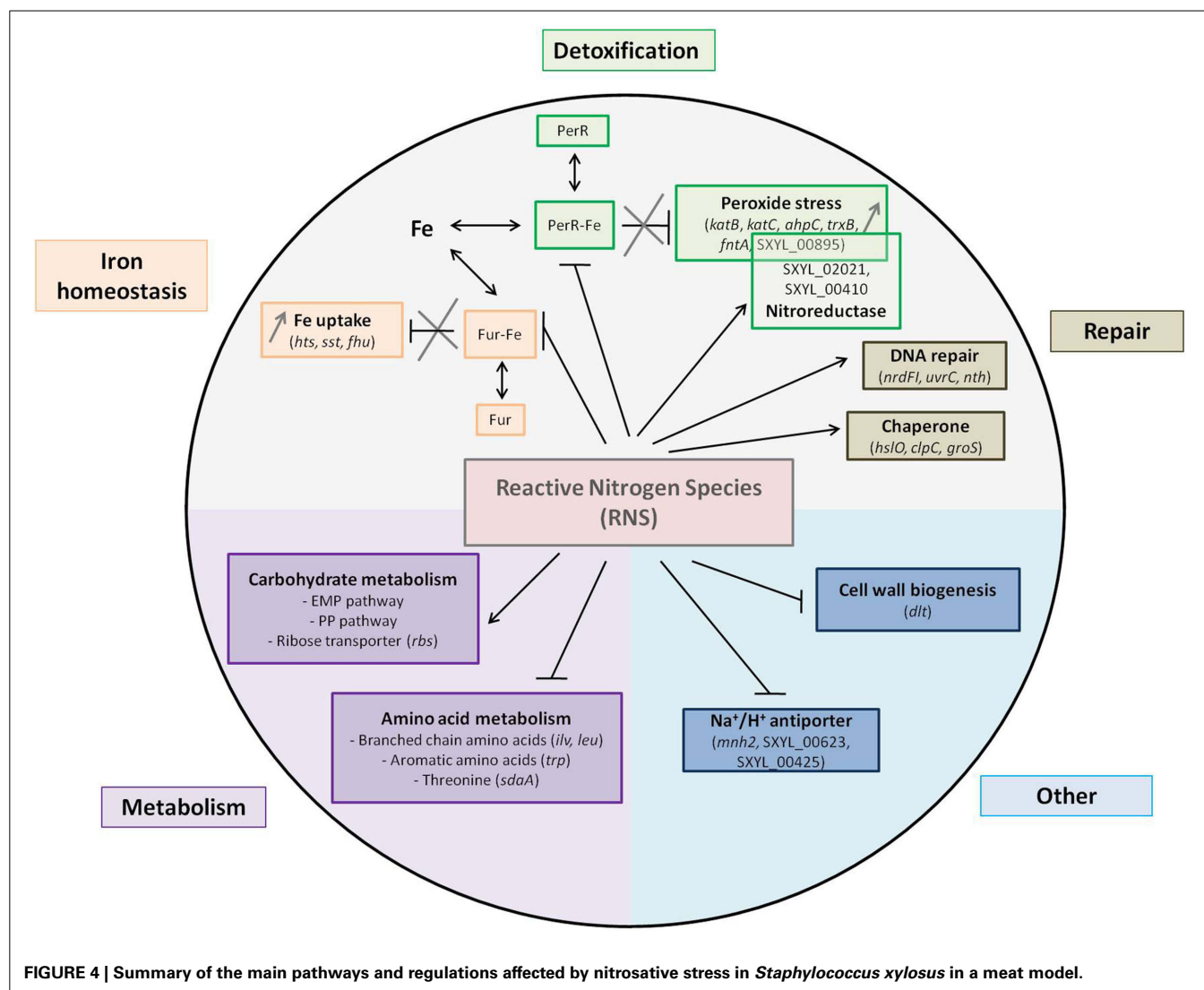


FIGURE 4 | Summary of the main pathways and regulations affected by nitrosative stress in *Staphylococcus xylosus* in a meat model.

and detoxification mechanisms (Table 1, Figure 4). Among these genes, three encode catalases with *katA* down-regulated and *katB* and *katC* up-regulated. Most staphylococci are catalase-positive with the majority, like *S. aureus*, having a single catalase (Gaupp et al., 2012). *S. carnosus* has two catalases (Rosenstein et al., 2009). Some strains of *S. xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus equorum* have been reported to have two catalases (Blaiotta et al., 2010). The *S. xylosus* strain C2a has three catalases. The transcription of *katA* in this strain is induced upon entry into the stationary phase, by oxygen and by hydrogen peroxide, whereas iron and manganese have a repressive effect (Barrière et al., 2002). *KatB* and *KatC* were identified in the cell envelope of this strain with *KatC* exhibiting similarity with *KatE* of *Bacillus subtilis* (Planchon et al., 2009). In addition, gene *ahpC* encoding alkyl hydroperoxide reductase, *trxB* encoding thioredoxin reductase and *bcp* for bacterioferritin comigratory protein were all up-regulated. In *S. aureus*, catalase detoxifies H_2O_2 while *AhpC* confers resistance to other ROS (Gaupp et al., 2012). After NO stress, *KatA* and *AhpF* were overexpressed in *B. subtilis*

but not in *S. aureus* (Hochgräfe et al., 2008). Bacterioferritin comigratory protein (*Bcp*) functions as an iron chelator and is homologous to a thioreductase-peroxidase and as such is likely involved in the thiol-dependent reduction of peroxides (Gaupp et al., 2012). As described for other bacteria, the thioredoxin system of *S. xylosus* comprises thioredoxin (*trxA*) and thioredoxin reductase (*trxB*). Transcription of these two genes is increased in response to diamide, H_2O_2 , heat, salt or ethanol stress in *B. subtilis* and in *S. aureus* (Gaupp et al., 2012). Thioredoxins are major contributors to oxidative resistance by facilitating the reduction of H_2O_2 , and by scavenging HO^\bullet (Gaupp et al., 2012). They help maintain protein thiols in their reduced form and thus the reduced state of the cytoplasm. Moreover, to respond to the nitrosative stress, the gene *bsaA* encoding glutathione peroxidase, which catalyzes the reduction of H_2O_2 , and the gene SXYL_00570, which encodes ferredoxin-NADP reductase, were up-regulated in *S. xylosus*. In parallel to the up-regulation of *trxB*, the gene *msrA1* encoding a peptide methionine sulfoxide reductase (*Msr*) was up-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS

(**Table 1**). Msr catalyzes the reduction of free and bound methionine sulfoxide [Met-(S)-SO; Met-(R)-SO] (Moskovitz, 2005). The catalytic process, with thioredoxin as reducing agent, includes the production of a sulfenic intermediate with concomitant release of the repaired methionine and then a recycling step where oxidized Msr is reduced to its active form (Ezraty et al., 2005). The oxidized S form of methionine is reduced by the enzyme MsrA while the R form is reduced by MsrB. *S. aureus* contains three paralogs of *msrA* (*msrA1*, *msrA2*, *msrA3*) and a single *msrB* gene (Singh and Moskovitz, 2003; Ezraty et al., 2005). Similarly, *S. xylosus* contains three *msrA* genes and one *msrB*. In *S. aureus*, MsrA1 is the major contributor to tolerance of oxidative stress (Singh and Moskovitz, 2003).

Furthermore, two genes (SXYL_00895; SXYL_02021) encoding two probable nitroreductases and one gene (SXYL_00410) encoding a putative NAD(P)H nitroreductase were overexpressed in *S. xylosus* grown in the presence of RNS (**Table 1**, **Figure 4**). Nitroreductases have been classified into three classes: class A represented by *E. coli* NfsA and including *S. aureus* NfrA, class B represented by *E. coli* NfsB and class C including *S. aureus* NtrA (Tavares et al., 2009). The *S. aureus* NfrA is a flavin mononucleotide-dependent NADP oxidase involved in the oxidative stress response (Streker et al., 2005). In addition, this protein showed nitroreductase activity and weak disulfide reductase activity. The transcription of *nrfA* was strongly induced by nitrofurantoin, thiol-specific oxidant diamide and high concentrations of hydrogen peroxide, and a PerR box was identified (Streker et al., 2005). A putative PerR-binding site upstream of SXYL_00895 has been identified (**Figure 3**). As for *S. aureus*, this nitroreductase may play a role in the nitrosative stress response and help to maintain the thiol-disulfide balance. Moreover, SXYL_02021 shows a high degree of similarity with NtrA. NtrA has an S-nitroso-glutathione reductase activity involved in nitrosative metabolism (Tavares et al., 2009). Our results led us to suppose that in *S. xylosus* three nitroreductases could be involved in the response to nitrosative stress.

The gene *per* encoding the transcriptional regulator PerR, which belongs to the Fur family, was up-regulated in the presence of RNS in *S. xylosus* (**Table 1**). As a member of the Fur family, the activity of PerR is dependent on metal ions (Horsburgh et al., 2001b). In *B. subtilis*, PerR carries structural zinc and its DNA-binding activity is enhanced by Fe (II) or Mn (II) (Gaupp et al., 2012). PerR, containing Fe or Mn, functions as a transcriptional repressor by binding to a consensus DNA sequence called the PerR Box (Horsburgh et al., 2001a; Gaupp et al., 2012). *S. aureus* PerR regulates genes for antiperoxidative enzymes and iron storage proteins and represses the *fur* gene, which controls iron homeostasis. We looked for the PerR box in *S. xylosus* genes involved in iron acquisition and storage and antioxidant properties by using the consensus sequence of 17-bp described for *S. aureus* (Horsburgh et al., 2001a,b). We found a putative PerR-binding site upstream of the coding sequences of *katB*, *katC*, *ahpC*, *trxB*, and *fntA* (**Figure 3**). No PerR box was found upstream of the *katA* gene, which was down-regulated in response to RNS, the expression of *katB* and *katC* being up-regulated under the probable control of PerR. PerR boxes were also found in the promoter regions of *fur* and *perR*, suggesting autoregulation (**Figure 3**). The

nitrosative stress in *S. xylosus* resulted in a response similar to that for peroxide stress in *S. aureus*, except that transcription of *perR* was also increased. PerR has been identified as a peroxide-sensing protein (Horsburgh et al., 2001a). It is only the Fe (II)-bound PerR that shows pronounced sensitivity to low levels of peroxide (Lee and Hellmann, 2006). In the presence of H₂O₂, the iron in PerR leads to formation of a hydroxyl radical which oxidizes histidines at the binding site and prevents DNA binding (Fillat, 2014). In *S. aureus*, addition of H₂O₂ results in increased transcription of most of the PerR regulon except for *fur* and *perR* itself (Horsburgh et al., 2001a). As already mentioned above, Fur was inactivated by nitrosative stress and consequently transcription of the Fur regulon was increased, resulting in iron uptake. Elevated iron concentration could affect the distribution between the two forms of PerR, PerR-Fe, which is sensitive to oxidation, and the less sensitive PerR-Mn (Horsburgh et al., 2001a), and thus will induce the PerR regulon thereby keeping the system going (**Figure 4**). It is worth noting that the gene *mntH* encoding the transport of manganese was up-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS. Mn (II) is important for detoxification because it has a higher reduction potential than Fe (II), and it can function as an antioxidant, unlike iron, which is a pro-oxidant metal (Gaupp et al., 2012).

CARBOHYDRATE TRANSPORT AND METABOLISM

Glucose (0.5%) added to the two meat batches supported the growth of *S. xylosus* for up to 24 h. Glycogen from meat could therefore be a source of glucose and ATP from meat could be a source of ribose and contribute to energy production (Chaillou et al., 2005). Indeed, genes encoding enzymes involved in the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) and the pentose phosphate (PP) pathways were modulated at t_{24h} and t_{72h} in the presence of RNS (**Table 1**) (**Figure 4**). Each of these pathways has its own function. The EMP pathway (combined with the tricarboxylic acid cycle) is the general route for glucose catabolism and energy formation in the cell, while the PP pathway plays a crucial role in redox metabolism (Kleijn et al., 2006). Four genes (SXYL_02255, SXYL_00253, SXYL_00278, SXYL_00626) encoding phosphotransferase systems (PTS) that catalyze the concomitant uptake and phosphorylation of carbohydrates were modulated (**Table 1**). The two genes paralogs (SXYL_02255, SXYL_00626) coding for a PTS for alpha-glucoside and the gene (SXYL_00278) coding for a fructose-specific PTS system were up-regulated at t_{24h}, while the gene SXYL_00253 was down-regulated (**Table 1**). Five other genes (*malA*, *pgi*, *fbp*, *iolJ*, *fda*) of the EMP and/or PP pathway were also up-regulated (**Table 1**). Genes encoding enzymes involved in the uptake and metabolism of two substrates (ribose, arabinose) were modulated by RNS (**Table 1**). Three of them coding for the ribose ABC transporter (*rbsB*, *rbsC*, *rbsD*) were up-regulated at t_{24h} (**Figure 4**). For arabinose metabolism, the genes *araT*, *araA* and *araD* were down-regulated in the presence of RNS (**Table 1**). These genes belong to a cluster of five genes (*araRB-DAT*) that encode proteins for uptake of arabinose and conversion to D-xylulose-5P, which can enter the pentose phosphate pathway (Siezen et al., 2008; Passerini et al., 2013). This cluster has not yet been characterized in *Staphylococcus*. Moreover, the presence of RNS modulated the transcription of two genes (*araB1*, *araB2*)

encoding ribulokinases involved in the pentose interconversion (Table 1).

Because of the importance of these two metabolic pathways, staphylococci have regulators that sense the availability of these metabolites. Nitrosative stress can alter enzymatic activity resulting in changes in metabolite concentrations and redox balance; these changes will induce the response of these regulators. One form of carbon catabolite repression relying on a transcriptional regulator termed CcpA was up-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS at t_{24h} (Table 1). This regulator requires the co-repressor P-Ser-HPr to bind efficiently to its operator sequence *cre* (catabolite responsive element) (Brückner and Titgemeyer, 2002). In our study, the gene coding for the co-repressor was not modulated.

AMINO ACID TRANSPORT AND METABOLISM

Transcript levels of eight genes involved in the metabolism of branched-chain amino acids (*ilv*, *leu* genes co-localized) and one involved in their transport (*brnQ-1*) were found to be down-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS (Table 1, Figure 4). In fermented sausages, catabolism of branched-chain amino acids (leucine, isoleucine, valine) results in methyl aldehydes, alcohols and acids involved in flavor (Stahnke, 1995). *S. xylosus* plays a fundamental role in this metabolism (Stahnke, 1999). Nitrate or nitrite was found to inhibit the degradation of leucine by *S. xylosus* in meat extract and in laboratory media (Moller et al., 1998; Olesen et al., 2004). This inhibition could be explained by the down-regulation of several genes involved in this metabolism.

Five genes involved in glycine/serine/threonine metabolism were also modulated (Table 1). Three of these genes organized in a cluster (*gcvT*, *gcvPA*, *gcvPB*) were up-regulated while two genes (*sdaAA1*, *sdaAB1*) coding for two subunits of the enzyme L-serine dehydratase, which belongs to the iron sulfur-dependent L-serine dehydratase family, were down-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS (Figure 4).

Sulfur-containing amino acids such as methionine and aromatic amino acids (tryptophan, phenylalanine, and tyrosine) can be oxidized during nitrosative stress (Gaupp et al., 2012). In our conditions, one gene (SXYL_00012) encoding a protein involved in methionine synthesis and 12 genes coding for proteins involved in aromatic amino acid synthesis were modulated (Table 1). Seven genes (*trpA* to *trpG*) encoding enzymes involved in tryptophan synthesis were organized in one cluster in *S. xylosus* as reported for most Gram-positive bacteria (Gutierrez-Preciado et al., 2005). Six of these genes and the gene SXYL_01128 encoding a DAHP synthase-chorismate mutase were down-regulated in our conditions (Table 1). Nitrosative stress can also modulate the expression of genes involved in sulfur-containing amino acids synthesis (Figure 4).

Transcript levels of 11 genes encoding enzymes involved in the urea cycle and metabolism of amino groups were modulated in *S. xylosus* in the presence of RNS (Table 1). Four of them (*rocD1*, *argC*, *argB*, SXYL_02450) coding for enzymes involved in the metabolism of ornithine were down-regulated. The gene *ansA* coding for an enzyme involved in aspartate metabolism, which can fuel the urea cycle, the gene *argG* coding for a urea cycle enzyme and six genes (*ure*) coding for urease were

up-regulated. Urease activity generates ammonium which is a source of nitrogen, but ammonium ions can also alkalinize the cytoplasm and contribute to the ΔpH component of the membrane potential, or the ammonia molecule can diffuse from the cells (Jose et al., 1994; Burne and Chen, 2000). Urease activity can furnish *S. xylosus* with ammonium and protect it against the acid pH of the meat model (pH 5.7), but in our conditions there was no difference in pH with or without nitrate and nitrite.

Transcript levels of four genes (*ampA*, SXYL_01931, SXYL_01348, *dapE*) encoding peptidases with metallopeptidase activity were found to be up-regulated (Table 1). The gene SXYL_01931 encodes an oligoendopeptidase F. The *S. aureus* corresponding gene was up-regulated after vancomycin treatment or after exposure to $AgNO_3$, which caused oxidative stress (Kuroda et al., 2003; Smith et al., 2012). The cytosol aminopeptidase encoded by the gene *ampA* (DQ498891) has already been identified in the cell envelope fraction of *S. xylosus* (Planchon et al., 2007). This aminopeptidase binds manganese ions, and it is noteworthy that the expression of the gene *mntH* involved in manganese transport was also up-regulated.

Osmotolerance is one of the characteristic features of staphylococci. They can import osmoprotectants by several transport systems (Kuroda et al., 2005). In our study, the cluster *opuC* (*opuCABCD*) encoding a glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter was down-regulated at t_{24h} , but the *opuCC* and *opuCD* genes were up-regulated at t_{72h} (Table 1). This late up-regulation may indicate a modification of the osmotic pressure. In contrast, the gene *opuD1* coding for an uptake system of glycine betaine was down-regulated over time in the presence of RNS (Table 1). The down-regulation of *opuD* has already been reported in *S. aureus* subject to combined oxidative and nitrosative stresses (Nobre and Saraiva, 2013). The transporters OpuC and OpuD may respond differently to osmotic environments, but it is not clear why these genes are modulated in our conditions.

ENERGY PRODUCTION AND CONVERSION

The gene *atpD* coding for one subunit of ATPase synthase was down-regulated at t_{24h} in the presence of RNS (Table 1). ATPase synthase genes were down-regulated in *Desulfovibrio vulgaris* after nitrite stress (He et al., 2006). These results suggest that the electron flow was likely shifted from respiratory phosphorylation to nitrate reduction (He et al., 2006).

In our study, five Na^+/H^+ antiporter systems were modulated by addition of nitrate and nitrite: either encoded by single genes (SXYL_00623, SXYL_00425, *nhaC*) or by clusters of genes (*mnh*) (Table 1, Figure 4). Sodium proton antiporters are ubiquitous membrane proteins involved in cell energetics and play a primary role in the homeostasis of intracellular pH and cellular Na^+ content, the establishment of an electrochemical potential of Na^+ and cell volume. Nine different Na^+/H^+ antiporters have been identified in Gram-positive and Gram-negative bacteria (Majernik et al., 2001; Lorca et al., 2007). Bacteria have several antiporters catalyzing ostensibly similar reactions and the contribution of each antiporter is not yet established. Antiporter Mnh belongs to the cation/proton antiporter-3 (Mrp) family (Swartz et al., 2007). Mrp antiporters require six or seven genes for full activity and are highly conserved. Two Mnh antiporters encoded by two

operon paralogs (*mnh*, *mnh2*) of seven genes have been described in *S. aureus* (Hiramatsu et al., 1998; Swartz et al., 2007). Similarly, seven genes (*mnhA* to *mnhG*) are also present in the two *S. xylosus* *mnh* cluster paralogs. In the *mnh* cluster, only *mnhG* was up-regulated in *S. xylosus* at t_{72h} , while in the *mnh2* cluster, five genes (*mnh2ADEFG*) were down-regulated at t_{24h} (Table 1, Figure 4). The expression of *nhaC* coding for the Na^+/H^+ antiporter NhaC of *S. xylosus* was up-regulated in the presence of RNS at t_{24h} and t_{72h} (Table 1). The modulation by RNS of genes encoding Na^+/H^+ antiporters has not yet been described. But stresses such as pH, salt, temperature and interplay between these stresses can regulate the level of expression and activity of these antiporters (Padan et al., 2005). Further studies are required to define the specific mechanisms that modulate the efficacy of the antiporters and in some cases their capacity to catalyze multiple activities.

CELL WALL/MEMBRANE BIOGENESIS

Transcript levels of four genes (*dltA*, *dltB*, *dltC*, *dltD*) involved in D-alanylation of teichoic acids were down-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS (Table 1, Figure 4). These four genes are organized in an operon (AF032440) (Peschel et al., 1999). Esterification of D-alanine to teichoic acids has pleiotropic effects such as regulation of autolysins, binding of cations (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) to the cell envelope and resistance to antimicrobial cationic peptides and proteins (Neuhaus and Baddiley, 2003; Schneewind and Missiakas, 2014). In *S. aureus*, the degree of D-alanylation depends on the environmental conditions, and decreases with increase in pH, temperature or salt (Neuhaus and Baddiley, 2003). Moreover, *dlt* expression is repressed in response to Na^+ , Mg^{2+} , and Ca^{2+} (Koprivnjak et al., 2006). It is noteworthy that in our conditions the gene *mgE* coding for a protein involved in magnesium transport and the gene *nhaC* coding for an antiporter involved in the uptake of Na^+ were up-regulated in *S. xylosus*.

DNA SYNTHESIS AND REPAIR

Transcript levels of three genes encoding ribonucleoside reductases (RNRs) were modulated (Table 1). Two of them (*ndrI*, *nrdF*) were up-regulated, while *nrdG* was down-regulated. RNRs are enzymes essential for the synthesis of deoxyribonucleotides, the precursors of DNA synthesis or repair (Figure 4). They catalyze the reduction of the four ribonucleotides to maintain a pool of deoxyribonucleotides during the cell cycle. Three classes of RNRs are known (Rabinovitch et al., 2010). *S. aureus* contains Class Ib and class III RNRs, which are essential for aerobic and anaerobic growth, respectively (Masalha et al., 2001). Class III RNRs are encoded by *nrdD* and *nrdG* genes in *S. aureus* (Masalha et al., 2001). Similar organization is found in the genome of *S. xylosus*, but *nrdD* is truncated, i.e., a pseudogene. It is worth noting that two truncated parts of *nrdD* (SXYL_00148; SXYL_00149) were transcriptionally active and were also down-regulated, as mentioned for *ndrG*. The class Ib NrdEF is encoded by the *nrdE* and *nrdF* genes, which form an operon containing a third gene *nrdI* which overlaps with *nrdE* in *S. aureus* (Masalha et al., 2001). We observed the same cluster of three genes *nrdIEF* in the *S. xylosus* genome. In *S. aureus*, NrdEF are able to function with thioredoxin reductase as the donor of hydrogen (Rabinovitch et al., 2010). In our study, the expression of the gene *trxB* encoding thioredoxin

reductase was up-regulated (Table 1). In *E. coli*, expression of the *nrdHIEF* operon is triggered in response to oxidative stress (Monje-Casas et al., 2001). This induction is mediated by the inactivation of Fur (Martin and Imlay, 2011). In our study, as already stated, nitrosative stress inactivated Fur in *S. xylosus*, and a similar mechanism could explain the up-regulation of *nrdI* and *nrdF* (Figure 4).

Four genes (*folD*, *folB*, *folK*, *folP*) encoding proteins involved in the synthesis of folate were up-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS (Table 1). As *S. xylosus* C2a is able to grow in a minimal medium including only three vitamins (thiamine, nicotinic acid, and biotin) (Fiegler and Brückner, 1997), we can suppose that it has the capacity to synthesize folate. Folate is required as a cofactor in one-carbon-atom transfer reactions, including methionine, purine, and thymine syntheses, and it has been proposed as an antioxidant that scavenges peroxyl, azide and hydroxyl radicals (Huang et al., 2004; Rossi et al., 2011).

Two genes, *nth* encoding an endonuclease type III and *uvrC* encoding UvrABC system protein C, involved in DNA excision repair were up-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS (Table 1, Figure 4). In *E. coli*, pyrimidine lesions generated by free radical HO are recognized by endonuclease types III and VIII (Wallace, 1988). The complex UvrABC is involved in nucleotide excision and repair, and the genes *uvrABC* are reported in *S. aureus* (Ambur et al., 2009) and also present as a cluster in *S. xylosus*.

POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION, PROTEIN TURNOVER, CHAPERONES

Chaperones and ATP-dependent proteases play a major role in bacterial survival under conditions of stress where proteins tend to unfold and aggregate. In our conditions, nitrosative stress leads to an increase in the expression of *hslO* (heat shock protein 33 homolog), *clpC* (ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpC) and *groS*, (Table 1, Figure 4). The heat shock protein Hsp33 was first found to be induced by heat shock, but it has been discovered that it requires both unfolding as well oxidative conditions to become active (Ilbert et al., 2007). Hsp 33 contains a bound Zn^{2+} ion coordinated by four cysteines, and under oxidizing conditions two disulfide bonds are formed involving the reactive cysteines, while under reducing conditions zinc is bound to the reactive cysteines and the protein is inactive. It is worth noting that the gene *czrA* encoding a zinc and cobalt repressor was up-regulated in *S. xylosus* (Table 1), as already described for *S. aureus* during nitrosative stress (Nobre and Saraiva, 2013). The gene *clpC* has been shown to be induced in heat-shocked cells in *S. aureus* (Frees et al., 2004). It is noteworthy that the expression of the heat-inducible transcription repressor *hcrA* was down-regulated in *S. xylosus* in the presence of RNS. In *S. aureus*, HrcA regulator is required to repress transcription of *groS* and is modulated by the thiol-specific oxidant diamide (Wolf et al., 2008).

CONCLUSIONS

In this study, determination of the global gene expression of *S. xylosus* *in situ* in meat in the presence of nitrate and nitrite at the levels used in the meat industry has allowed us to unravel the

adaptive response of this bacterium to nitrosative stress. *S. xylosus* counteracts nitrosative stress by developing several oxidative stress resistance mechanisms such as modulation of the expression of genes involved in iron homeostasis mostly under the control of Fur, detoxifying enzymes mostly under the control of PerR, and DNA and protein repairs. Nitrosative stress could alter Fe-S clusters and sulfur-containing proteins and *S. xylosus* adapts to these changes in metabolite concentrations by modulating the expression of several genes involved in carbon and nitrogen metabolism, energy production and cell wall biogenesis. Our results offer the sole data set for the response of a food-associated bacterium when exposed to nitrate and nitrite in meat. Despite the low concentration of nitrate and nitrite used, a significant change in the *S. xylosus* gene expression was observed. The strategies to reduce the input of nitrate and nitrite in meat products should also take into account the potential impact on bacterial starter cultures.

ACKNOWLEDGMENTS

Aurore Vermassen is a PhD Research Fellow funded by the French “Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (M.E.N.E.S.R.).” The microarray development was financially supported by the ANR project “Genoferment” ANR-05-PNRA-020. We are grateful to Pierre Micheau for his assistance in data organization and to Souad Christeians (ADIV Viande Performances) for her assistance in nitrate-nitrite measurements in meat. We would like to thank Jean-Paul Chacornac for valuable technical assistance with meat inoculation and sampling. The authors are grateful to David Marsh for correcting our English.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fmicb.2014.00691/abstract>

REFERENCES

- Ambur, O. H., Davidsen, T., Frye, S. A., Balasingham, S. V., Lagesen, K., Rognes, T., et al. (2009). Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 453–470. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00173.x
- Andrews, S. C. (1998). Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 40, 281–351. doi: 10.1016/S0065-2911(08)60134-4
- Barrière, C., Brückner, R., Centeno, D., and Talon, R. (2002). Characterisation of the *katA* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 277–283. doi: 10.1016/S0378-1097(02)01030-3
- Barrière, C., Brückner, R., and Talon, R. (2001a). Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4096–4104. doi: 10.1128/AEM.67.9.4096-4104.2001
- Barrière, C., Leroy-Sétrin, S., and Talon, R. (2001b). Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *J. Appl. Microbiol.* 91, 514–519. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01411.x
- Beasley, F. C., and Heinrichs, D. E. (2010). Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *J. Inorg. Biochem.* 104, 282–288. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.09.011
- Blaiziot, G., Fusco, V., Ercolini, D., Pepe, O., and Coppola, S. (2010). Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J. Clin. Microbiol.* 48, 192–201. doi: 10.1128/JCM.00542-09
- Brückner, R., and Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 141–148. doi: 10.1016/S0378-1097(02)00559-1
- Burne, R. A., and Chen, Y. Y. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes Infect.* 2, 533–542. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00312-9
- Cammack, R., Joannou, C. L., Xiao-Yuan, C., Martinez, C. T., Maraj, S. R., and Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 475–488. doi: 10.1016/S0005-2728(99)00033-X
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M. C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A. M., Dudez, A. M., Martin, V., et al. (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* 23, 1527–1533. doi: 10.1038/nbt1160
- Coton, E., Desmonts, M.-H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christeians, S., et al. (2010). Biodiversity of coagulase-negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 221–229. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.023
- D’Aurèaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M., and Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16619–16624. doi: 10.1073/pnas.252591299
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Ten Brink, B., et al. (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Res. Int.* 33, 171–180. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00031-4
- Ezraty, B., Aussel, L., and Barras, F. D. R. (2005). Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 221–229. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.017
- Fedtko, I., Kamps, A., Krümer, B., and Götz, F. (2002). The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. *J. Bacteriol.* 184, 6624–6634. doi: 10.1128/JB.184.23.6624-6634.2002
- Fiegler, H., and Brückner, R. (1997). Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 181–187. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb10286.x
- Fillat, M. F. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* 546, 41–52. doi: 10.1016/j.abb.2014.01.029
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sorensen, K., Hill, P., Msadek, T., et al. (2004). Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 54, 1445–1462. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04368.x
- García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., and Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *Int. J. Food Microbiol.* 54, 189–195. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00192-0
- Gaupp, R., Ledala, N., and Somerville, G. A. (2012). Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:33. doi: 10.3389/fcimb.2012.00033
- Götterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., and Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 303–310. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.034
- Gutierrez-Preciado, A., Jensen, R. A., Yanofsky, C., and Merino, E. (2005). New insights into regulation of the tryptophan biosynthetic operon in gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 21, 432–436. doi: 10.1016/j.tig.2005.06.001
- Haley, K. P., and Skaar, E. P. (2012). A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes Infect.* 14, 217–227. doi: 10.1016/j.micinf.2011.11.001
- Hammer, N. D., and Skaar, E. P. (2011). Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 129–147. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102851
- Hammes, W. P. (2012). Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiol.* 29, 151–156. doi: 10.1016/j.fm.2011.06.016
- Hassan, H. M., and Troxell, B. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:59. doi: 10.3389/fcimb.2013.00059
- He, Q., Huang, K. H., He, Z., Alm, E. J., Fields, M. W., Hazen, T. C., et al. (2006). Energetic consequences of nitrite stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough,

- inferred from global transcriptional analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4370–4381. doi: 10.1128/AEM.02609-05
- Hiramatsu, T., Kodama, K., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1998). A putative multisubunit Na^+/H^+ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 180, 6642–6648.
- Hochgräfe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S., et al. (2008). Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 190, 4997–5008. doi: 10.1128/JB.01846-07
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.* 78, 68–76. doi: 10.1016/j.meatsci.2007.05.030
- Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S. J. (2001a). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 69, 3744–3754. doi: 10.1128/IAI.69.6.3744-3754.2001
- Horsburgh, M. J., Ingham, E., and Foster, S. J. (2001b). In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* 183, 468–475. doi: 10.1128/JB.183.2.468-475.2001
- Huang, R. F., Yaong, H. C., Chen, S. C., and Lu, Y. F. (2004). *In vitro* folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Br. J. Nutr.* 92, 887–894. doi: 10.1079/BJN20041259
- Ilbert, M., Horst, J., Ahrens, S., Winter, J., Graf, P. C., Lilie, H., et al. (2007). The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 556–563. doi: 10.1038/nsmb1244
- Jose, J., Schafer, U. K., and Kaltwasser, H. (1994). Threonine is present instead of cysteine at the active site of urease from *Staphylococcus xylosus*. *Arch. Microbiol.* 161, 384–392. doi: 10.1007/BF00288947
- Kleijn, R. J., van Winden, W. A., Ras, C., van Gulik, W. M., Schipper, D., and Heijnen, J. J. (2006). ^{13}C -labeled gluconate tracing as a direct and accurate method for determining the pentose phosphate pathway split ratio in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4743–4754. doi: 10.1128/AEM.02955-05
- Kloos, W. E., Zimmerman, R. J., and Smith, R. F. (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 53–59.
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A., and Weiss, J. P. (2006). Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188, 3622–3630. doi: 10.1128/JB.188.10.3622-3630.2006
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H., and Hiramatsu, K. (2003). Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 49, 807–821. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03599.x
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., et al. (2005). Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13272–13277. doi: 10.1073/pnas.0502950102
- Lee, J. W., and Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H_2O_2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363–367. doi: 10.1038/nature04537
- Leroy, F., Verluyten, J., and De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270–285. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027
- Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hovorup, R. N., et al. (2007). Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochim. Biophys. Acta* 177, 1–17. doi: 10.1016/j.bbame.2007.02.007
- Majernik, A., Gottschalk, G., and Daniel, R. (2001). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *J. Bacteriol.* 183, 6645–6653. doi: 10.1128/JB.183.22.6645-6653.2001
- Martin, J. E., and Imlay, J. A. (2011). The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol. Microbiol.* 80, 319–334. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07593.x
- Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., and Cohen, G. (2001). Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J. Bacteriol.* 183, 7260–7272. doi: 10.1128/JB.183.24.7260-7272.2001
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., and Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci.* 67, 149–158. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.10.003
- Moller, J. K., Hinrichsen, L. L., and Andersen, H. J. (1998). Formation of amino acid (L-leucine, L-phenylalanine) derived volatile flavour compounds by *Moraxella phenylpyruvica* and *Staphylococcus xylosus* in cured meat model systems. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 101–117. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00069-5
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.-J., Holmgren, A., and Pueyo, C. (2001). Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*: condition that trigger the transport level *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 276, 18031–18037. doi: 10.1074/jbc.M011728200
- Morrissey, J. A., Cockayne, A., Brummell, K., and Williams, P. (2004). The staphylococcal ferritins are differentially regulated in response to iron and manganese and via PerR and Fur. *Infect. Immun.* 72, 972–979. doi: 10.1128/IAI.72.2.972-979.2004
- Moskovitz, J. (2005). Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 213–219. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.09.003
- Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L. A., LaRossa, R. A., and Storz, G. (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 745–750. doi: 10.1073/pnas.0307741100
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S., et al. (2002). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 245–250. doi: 10.1292/jvms.64.245
- Neubauer, H., and Götz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* 178, 2005–2009.
- Neubauer, H., Pantel, I., and Götz, F. (1999). Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*. *J. Bacteriol.* 181, 1481–1488.
- Neuhauser, F. C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686–723. doi: 10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003
- Nobre, L. S., and Saraiva, L. M. (2013). Effect of combined oxidative and nitrosative stresses on *Staphylococcus aureus* transcriptome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2563–2573. doi: 10.1007/s00253-013-4730-3
- Olesen, P. T., Stahnke, L., and Talon, R. (2004). Effect of ascorbate, nitrate and nitrite on the amount of flavour compounds produced from leucine by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Sci.* 68, 193–200. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.02.017
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., and Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochim. Biophys. Acta* 170, 67–88. doi: 10.1016/j.bbame.2005.09.010
- Passerini, D., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Fontagné-Faucher, C., et al. (2013). The carbohydrate metabolism signature of *Lactococcus lactis* strain A12 reveals its sourdough ecosystem origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5844–5852. doi: 10.1128/AEM.01560-13
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., and Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 8405–8410. doi: 10.1074/jbc.274.13.8405
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Planchon, S., Chambon, C., Desvaux, M., Chafsey, I., Leroy, S., Talon, R., et al. (2007). Proteomic analysis of cell envelope from *Staphylococcus xylosus* C2a, a coagulase-negative *Staphylococcus*. *J. Proteome Res.* 6, 3566–3580. doi: 10.1021/pr070139+
- Planchon, S., Desvaux, M., Chafsey, I., Chambon, C., Leroy, S., Hébraud, M., et al. (2009). Comparative subproteome analyses of planktonic and sessile *Staphylococcus xylosus* C2a: new insight in cell physiology of a coagulase-negative *Staphylococcus* in biofilm. *J. Proteome Res.* 8, 1797–1809. doi: 10.1021/pr8004056

- Rabinovitch, I., Yanku, M., Yeheskel, A., Cohen, G., Borovok, I., and Aharonowitz, Y. (2010). *Staphylococcus aureus* NrdH redoxin is a reductant of the class Ib ribonucleotide reductase. *J. Bacteriol.* 192, 4963–4972. doi: 10.1128/JB.00539-10
- Richardson, A. R., Dunman, P. M., and Fang, F. C. (2006). The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Mol. Microbiol.* 61, 927–939. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05290.x
- Rosenstein, R., Nerz, C., Biswas, L., Resch, A., Raddatz, G., Schuster, S. C., et al. (2009). Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 811–822. doi: 10.1128/AEM.01982-08
- Rossi, M., Amaretti, A., and Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3, 118–134. doi: 10.3390/nu3010118
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., and Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 53, 303–317. doi: 10.1002/jobm.201100552
- Schneewind, O., and Missiakas, D. (2014). Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 196, 1133–1142. doi: 10.1128/JB.01155-13
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. (1987). Universal chemical-assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Sheldon, J., and Heinrichs, D. (2012). The iron-regulated staphylococcal lipoproteins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:41. doi: 10.3389/fcimb.2012.00041
- Siezen, R. J., Starrenburg, M. J. C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D., and van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 424–436. doi: 10.1128/AEM.01850-07
- Singh, V. K., and Moskovitz, J. (2003). Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology* 149, 2739–2747. doi: 10.1099/mic.0.26442-0
- Smith, A., Rowan, R., McCann, M., and Kavanagh, K. (2012). Exposure of *Staphylococcus aureus* to silver(I) induces a short term protective response. *Biometals* 25, 611–616. doi: 10.1007/s10534-012-9549-3
- Smith, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3, Article3. doi: 10.2202/1544-6115.1027
- Spiro, S. (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 193–211. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00061.x
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylo*sus at different temperatures and with different ingredient levels—Part II. Volatile components. *Meat Sci.* 41, 193–209. doi: 10.1016/0309-1740(94)00069-J
- Stahnke, L. H. (1999). Volatiles produced by *Staphylococcus xylo*sus and *Staphylococcus carnosus* during growth in sausage minces part II. The influence of growth parameters. *LWT Food Sci. Technol.* 32, 365–371. doi: 10.1006/fstl.1999.0560
- Streker, K., Freiberg, C., Labischinski, H., Hacker, J., and Ohlsen, K. (2005). *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. *J. Bacteriol.* 187, 2249–2256. doi: 10.1128/JB.187.7.2249-2256.2005
- Swartz, T. H., Ito, M., Ohira, T., Natsui, S., Hicks, D. B., and Krulwich, T. A. (2007). Catalytic properties of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* members of the secondary cation/proton antiporter-3 (Mrp) family are revealed by an optimized assay in an *Escherichia coli* host. *J. Bacteriol.* 189, 3081–3090. doi: 10.1128/JB.00021-07
- Talon, R., and Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Sci.* 89, 303–309. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.04.029
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., and Fadda, S. (2002). “Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products—Chapter 10,” in *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, ed F. Toldrá (Trivandrum: Research Signpost), 175–191.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C., and Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *Int. J. Food Microbiol.* 52, 47–56. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00127-0
- Tavares, A. F., Nobre, L. S., Melo, A. M., and Saraiva, L. M. (2009). A novel nitroreductase of *Staphylococcus aureus* with S-nitrosoglutathione reductase activity. *J. Bacteriol.* 191, 3403–3406. doi: 10.1128/JB.00022-09
- Tompkin, R. B. (1995). “Nitrite,” in *Antimicrobials in food*, 3rd Edn., eds P. M. Davidson, J. N. Sofos, and A. L. Branen (Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group), 170–221.
- Wallace, S. S. (1988). Ap endonucleases and dna glycosylases that recognize oxidative dna damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 12, 431–477. doi: 10.1002/em.2860120411
- Wolf, C., Hochgrafe, F., Kusch, H., Albrecht, D., Hecker, M., and Engelmann, S. (2008). Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: diverse responses to different oxidants. *Proteomics* 8, 3139–3153. doi: 10.1002/pmic.200701062

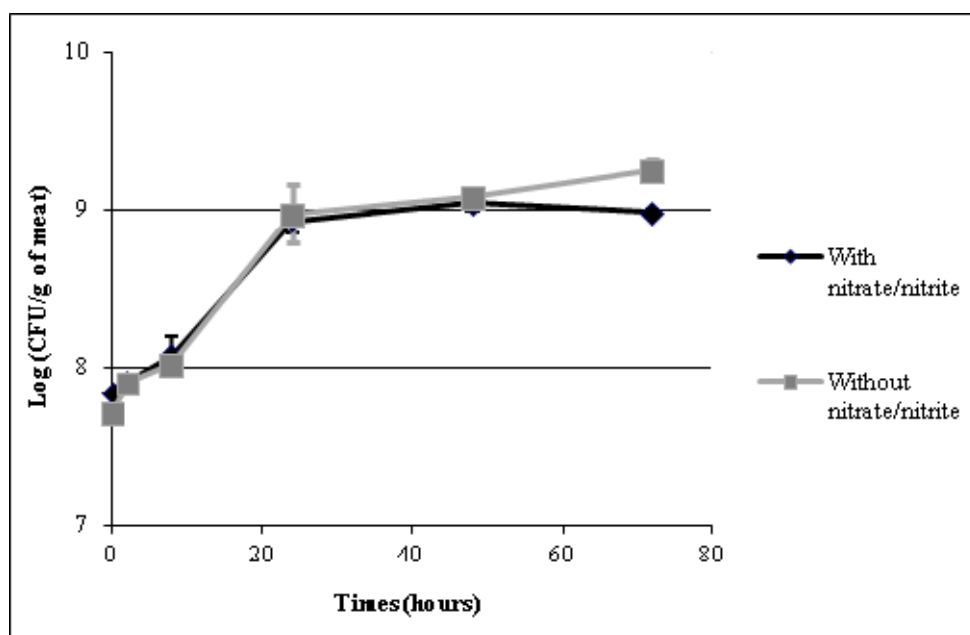
Conflict of Interest Statement: The Review Editor Yves Le Loir declares that, despite being previously involved in a joint funding project with the author Régine Talon, the review process was handled objectively and no conflict of interest exists. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 01 August 2014; accepted: 22 November 2014; published online: 15 December 2014.

Citation: Vermassen A, de la Foye A, Loux V, Talon R and Leroy S (2014) Transcriptomic analysis of *Staphylococcus xylo*sus in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress. *Front. Microbiol.* 5:691. doi: 10.3389/fmicb.2014.00691

This article was submitted to Microbial Physiology and Metabolism, a section of the journal *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2014 Vermassen, de la Foye, Loux, Talon and Leroy. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure 1. *Staphylococcus xylosus* growth over time in the presence or absence of nitrate and nitrite in the meat model.

Supplementary Table 1. Targeted genes of *Staphylococcus xylosus* for the validation of microarray data by qPCR: expression at t_{24h} or t_{72h} in meat in the presence of nitrate and nitrite.

Gene	Sequences of primers pairs for qPCR (5'-3')		Ratio of expression at indicated time as determined by:			
			Microarray		qPCR	
			24h	72h	24h	72h
<i>rpsB</i>	GCTAGAAGCAGGTGTTCACT	CCGCCATCTTCTGATACTTGT	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>queC</i>	GGCTATCGTAGTGTGTTAGTGGT	ATGTTGTCTCTGCAATGCG	0.4	0.5	0.6	0.6
<i>pheT</i>	TAACGTGCTTGTCTGAACGTAT	TGGCTCTACTTCACCAATGTC	0.6	0.7	0.8	0.6
<i>srtA</i>	TATCCAGGACCTGCTACACC	TGCCTACTTTTGCTCTGG	0.6	0.7	0.7	0.6
<i>leuC</i>	GCGACACTTGACCATAATGTG	CTGTTTCAGGTCCAACCATGT	0.2	0.2	0.4	0.4
<i>ilvC</i>	GGCTATGGATCTCAAGGACAC	ACAGGATATACTTCGAAGCCG	0.2	0.2	0.4	0.4
<i>trpC</i>	TGCTCGAACAGGGCTATTATG	GTGCTAAATCTCTACCTGGCA	0.5	0.3	0.7	0.5
<i>metK</i>	GTTGCTTGTGAGACGACAGTA	GCCATTGTCTGGCTATCGTA	0.4	0.3	0.5	0.4
<i>nrhI</i>	TGGTCACTGGAAACGATAGGAT	TCTGAGATAGACCGTCCAGC	1.5	3.0	1.9	4.6
<i>mntH</i>	TCCGTCAATGCTCATGGTAAG	GCACCACCTTGCATAGATGT	1.4	2.2	1.5	3.9
<i>ispD</i>	TAGCAGGCGGTATTGGTTC	CCTTCGTATGCGAAATCCAC	1.5	0.5	2.4	0.7
<i>rplJ</i>	GTGGTCTAAGCGTTGCTGA	GTAGCAACTGCAGTAGGACC	0.6	-	0.6	-
<i>dltD</i>	GGTACTGGTGGTTCGACAG	AACTGATTGAGCTGTGCCT	0.3	-	0.2	-
<i>proC</i>	GTGCTGGAATATGGCACATG	ATTGACGCCTAACTCATCAGC	1.5	-	1.5	-
<i>gcvT</i>	GATGGGCTATGCCAGTCC	ACTGTGCAGCTTCACTACC	3.3	-	6.0	-
<i>aroD</i>	TCGAACGAAGACTCAAGGTG	TTGCGATGCGCTGATTCTA	1.7	-	2.5	-
<i>ureA</i>	GCAGCAGATTTAGCTCGTAGA	CTCCATTACATCATCTCACC	3.1	-	3.9	-
<i>argC</i>	AGGTAGTGGTTATGGAGCGAT	GCGTTAAGTGACTCAAGTGAG	0.5	-	0.6	-
<i>hutG</i>	CTGGCACAACGTGATCTTTG	TCAGGACCTTCTTTAGCACC	1.9	-	2.1	-
<i>deoD</i>	TGTATTAATGCCAGGCGATCC	AATACTTGGTACGCCCATTC	2.0	-	2.4	-
<i>nagA</i>	GGACGCTTCATTGAAGGATT	TCCAACAATACTAGCTGCAT	1.7	-	2.6	-
<i>fruK</i>	AGGAGGCTTTCCAGGACAA	GTGGACCAGGCGCATTAAAT	0.6	-	0.6	-
SXYL_02582	ACGCCTGTAGCTCAAATAGTG	GGCTGCGAATTCTCTGGAAT	2.0	-	2.8	-
<i>drp35</i>	AGTGAGGTGCCTATTCTTGC	GAAGCAAAGCCCTTCAAGTTG	2.3	-	2.4	-
SXYL_00101	GCAGAAGAAGGTGCAAACG	GCGTTATTGACCAAGCCATC	2.0	-	8.5	-
<i>fldA</i>	TGGTAGTACACCTAAAGCGC	TGATGAAACAATACTGTACGC	2.2	-	2.6	-
<i>folB</i>	TTATCATGGCGCGTTACCA	GGCTTCCCTTCCATAATCGC	1.6	-	2.1	-
<i>fabD</i>	ATAGCTTAGGCGAGTATGCG	AACTTCCTCGTAATCCAAGCC	0.6	-	0.7	-
<i>hslO</i>	CGTGCATACAGTGCTTTGAC	CACCTTTCAACATAGCACCC	1.7	-	2.5	-
<i>panD</i>	CATAGAGCGAGAGTGACGG	ACCACTACCTCGTTACCTT	0.6	-	0.6	-
SXYL_00607	ATGGGCACAGTGTCATAGT	TTACGAGGTAATCGCCTGC	2.1	-	2.6	-
<i>ahpC</i>	CACAGCTAACGCTTATGATCC	CGAATGAGAAGTCTGTGGG	-	2.0	-	2.6
<i>ldh2</i>	GCAAGTGGAGAAGCTCTTGAT	ACTCGCAGCAACCACAATAA	-	0.6	-	0.6
<i>glpD</i>	GCACAAGGTACAAGTTCACG	AAGCATAAGTTCAGGTGTTGT	-	0.7	-	0.8
<i>tyrA</i>	ATGCAACACCCGTACAACA	TTGGATGGCCACCGATAAG	-	2.5	-	2.8
<i>carA</i>	ACGGCAATGACGGGTATC	GGTTGGCTGCTGCTTTCT	-	0.5	-	0.5
<i>guaB</i>	GGCTAGACAAGGTGGACTTG	ACCCATCAATGCTTCTGCTT	-	1.5	-	1.5
<i>bioB</i>	GAAGACGCAAGTGTGGATACA	TGCCACAATAGCCACAATT	-	0.4	-	0.3

Supplementary Table 2. Total genes of *Staphylococcus xylosus* differentially expressed over time in meat in the presence of nitrate and nitrite.

Prot ID	Gene ID	Gene name	Protein	COG distribution	24 hours of incubation			72 hours of incubation		
					Mean ratio	% of probes	Standard deviation	Mean ratio	% of probes	Standard deviation
SC#1012	SXYL_00783		Co Zn Cd efflux system component	C				1.9	78	0.21
SC#102	SXYL_00417		Aldehyde dehydrogenase	C				1.6	67	0.09
SC#110	SXYL_00425		Na ⁺ H ⁺ exchanger	C	0.6	78	0.08			
SC#1100	SXYL_00895		Nitroreductase family protein	C				1.8	100	0.17
SC#1124	SXYL_00917		Aldehyde dehydrogenase	C				1.5	80	0.05
SC#1200	SXYL_01024	<i>pflB</i>	Formate acetyltransferase	C				0.3	80	0.03
SC#13	SXYL_00327	<i>copA</i>	Copper-exporting P-type ATPase A	C				2.2	80	0.19
SC#1504	SXYL_01355	<i>proC</i>	Pyrroline-5-carboxylate reductase	C	1.5	70	0.02			
SC#1617	SXYL_01470		Acylphosphatase	C	1.6	100	0.05			
SC#1726	SXYL_01576	<i>glpD</i>	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	C				0.6	70	0.03
SC#1736	SXYL_01586	<i>mtaB</i>	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyladenine synthase	C	0.6	70	0.02	0.7	20	0.06
SC#1935	SXYL_01814		Putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	C	2.1	100	0.20	0.8	20	0.00
SC#1996	SXYL_01876	<i>qoxB</i>	Probable quinol oxidase subunit 1	C				0.6	90	0.01
SC#2135	SXYL_02021		Nitroreductase family protein	C	2.1	86	0.20			
SC#2330	SXYL_02220	<i>mnhG2</i>	Putative antiporter subunit G2	C	0.6	100	0.02			
SC#2331	SXYL_02221	<i>mnhF2</i>	Putative antiporter subunit F2	C	0.5	75	0.02			
SC#2332	SXYL_02222	<i>mnhE2</i>	Putative antiporter subunit E2	C	0.5	75	0.01			
SC#2333	SXYL_02223	<i>mnhD2</i>	Putative antiporter subunit D2	C	0.5	80	0.03			
SC#2336	SXYL_02226	<i>mnhA2</i>	Putative antiporter subunit A2	C	0.6	100	0.02	1.3	10	
SC#2440	SXYL_02331	<i>araB2</i>	Ribulokinase	C	1.7	22	0.04	0.5	78	0.01
SC#2558	SXYL_00830	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit beta	C	0.7	70	0.06			
SC#2604	SXYL_00512		Putative cation efflux family protein	C	0.6	80	0.07	0.6	70	0.03
SC#2777	SXYL_01775		Bacteriophage replication protein, DnaD/DnaB domain	C	0.5	83	0.07			
SC#49	SXYL_00363	<i>nhaC</i>	Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaC	C	2.0	90	0.36	2.2	80	0.41
SC#577	SXYL_00124	<i>araD</i>	L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase	C				0.4	89	0.08
SC#578	SXYL_00125	<i>araA</i>	L-arabinose isomerase	C				0.4	90	0.06
SC#579	SXYL_00126	<i>araT</i>	Arabinose-proton symporter	C				0.6	100	0.10
SC#596	SXYL_00181	<i>ugpQ</i>	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	C	2.1	100	0.18			
SC#624	SXYL_00276	<i>ldh2</i>	Lactate dehydrogenase	C	0.8	10		0.6	100	0.07
SC#826	SXYL_00577		L-lactate permease	C	0.2	70	0.03			
SC#857	SXYL_00607	<i>araB1</i>	Ribulokinase	C	2.0	90	0.12	1.6	20	0.00
SC#874	SXYL_00623		Putative Na ⁺ H ⁺ antiporter	C	0.5	90	0.02	0.3	90	0.03
SC#884	SXYL_00633		Putative formate/nitrite transporter	C	0.5	100	0.05	0.5	60	0.07
SC#922	SXYL_00670	<i>fdhD</i>	Protein FdhD homolog	C	2.0	89	0.08	1.6	22	0.02
SC#96	SXYL_00410		Putative NAD(P)H nitroreductase	C	1.9	75	0.11			
SC#1512	SXYL_01363	<i>scpB</i>	Segregation and condensation protein B	D	0.7	100	0.01			
SC#10	SXYL_00324		Putative aminotransferase	E				0.4	90	0.09
SC#1074	SXYL_00868	<i>leuD</i>	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	E	0.2	100	0.01	0.3	100	0.06
SC#1075	SXYL_00869	<i>leuC</i>	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	E	0.2	80	0.01	0.2	80	0.03
SC#1076	SXYL_00870	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	E	0.2	78	0.01	0.2	78	0.03
SC#1077	SXYL_00871	<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	E	0.2	80	0.02	0.2	80	0.03
SC#1078	SXYL_00872	<i>ihvC</i>	Ketol-acid reductoisomerase	E	0.2	90	0.01	0.2	90	0.01
SC#1080	SXYL_00874	<i>ihvB</i>	Acetolactate synthase	E	0.3	80	0.01	0.2	80	0.02
SC#1081	SXYL_00875	<i>ihvD1</i>	Dihydroxy-acid dehydratase	E	0.3	60	0.02	0.2	100	0.02
SC#1129	SXYL_00922	<i>pheA</i>	Prephenate dehydratase	E				0.6	67	0.04
SC#1257	SXYL_01095		Glycine/betaine ABC transporter substrate-binding protein	E	0.6	100	0.03			
SC#1292	SXYL_01128		DAHPh synthetase-chorismate mutase	E	1.6	44	0.17	0.5	100	0.06
SC#1311	SXYL_01148		Putative cysteine desulfurase	E	0.6	90	0.02			
SC#1346	SXYL_01184	<i>lysP</i>	Lysine-specific permease	E	0.4	80	0.03			
SC#1403	SXYL_01247		U32 family peptidase	E	0.6	80	0.02			
SC#1404	SXYL_01248		U32 family peptidase	E	0.6	70	0.02			
SC#1416	SXYL_01261	<i>aroE</i>	Shikimate dehydrogenase	E	0.6	90	0.02	1.3	20	0.01
SC#1469	SXYL_01316	<i>aroK</i>	Shikimate kinase	E				0.5	100	0.07
SC#1470	SXYL_01317	<i>gcvT</i>	Aminomethyltransferase	E	3.5	100	0.18			
SC#1471	SXYL_01318	<i>gcvPA</i>	Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 1	E	3.6	78	0.12			

SC#1472	SXYL_01319	<i>gcvPB</i>	Probable glycine dehydrogenase [decarboxylating] subunit 2	E	3.0	90	0.36			
SC#1497	SXYL_01348		Peptidase T-like protein	E	1.6	90	0.14			
SC#1522	SXYL_01373	<i>ansA</i>	L-asparaginase	E	1.8	67	0.07			
SC#1614	SXYL_01467		BCCT family transporter	E	0.5	89	0.05			
SC#1645	SXYL_01497	<i>trpA</i>	Tryptophan synthase alpha chain	E	0.6	63	0.03	0.5	75	0.04
SC#1646	SXYL_01498	<i>trpB</i>	Tryptophan synthase beta chain	E	0.6	20	0.01	0.4	70	0.08
SC#1648	SXYL_01500	<i>trpC</i>	Indole-3-glycerol phosphate synthase	E	0.6	78	0.05	0.4	100	0.05
SC#1649	SXYL_01501	<i>trpD</i>	Anthranilate phosphoribosyltransferase	E	0.5	70	0.10	0.4	80	0.15
SC#1650	SXYL_01502	<i>trpG</i>	Anthranilate synthase component II	E	0.5	86	0.08	0.4	86	0.13
SC#1651	SXYL_01503	<i>trpE</i>	Anthranilate synthase component I	E	0.5	89	0.05	0.4	89	0.13
SC#1662	SXYL_01513	<i>tyrA</i>	Prephenate dehydrogenase	E				3.1	70	1.01
SC#1685	SXYL_01535	<i>opuDI</i>	Glycine betaine transporter	E	0.5	70	0.02	0.5	60	0.05
SC#1829	SXYL_01686	<i>carB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase large chain	E	0.6	20	0.01	0.5	90	0.03
SC#1830	SXYL_01687	<i>carA</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	E	0.6	40	0.02	0.5	70	0.05
SC#2044	SXYL_01931		Oligoendopeptidase F	E	1.7	70	0.04			
SC#2076	SXYL_01961	<i>argG</i>	Argininosuccinate synthase	E				1.6	70	0.08
SC#2095	SXYL_01980	<i>ampA</i>	Cytosol aminopeptidase	E	1.9	90	0.24			
SC#2136	SXYL_02022	<i>aroD</i>	3-dehydroquinase dehydratase	E	1.7	100	0.14			
SC#2199	SXYL_02092		CHAP/ LysM domain protein	E				0.5	80	0.08
SC#2391	SXYL_02281	<i>spsB</i>	Signal peptidase IB	E	0.4	86	0.07			
SC#241	SXYL_02468		Putative arylamine N-acetyltransferase	E	2.0	88	0.14			
SC#2431	SXYL_02321		Amino acid permease family protein	E	0.5	90	0.02			
SC#247	SXYL_02474	<i>brnQI</i>	Branched-chain amino acid transport system II carrier protein	E	0.3	90	0.03	0.5	60	0.06
SC#2479	SXYL_02370		Putative pyridoxal phosphate-dependent acyltransferase	E	2.1	80	0.16			
SC#2603	SXYL_00490	<i>opuCC</i>	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter opuCC	E	0.3	78	0.01	1.8	78	0.14
SC#2677	SXYL_00867	<i>ilvA</i>	L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA	E	0.3	86	0.15	0.3	71	0.13
SC#370	SXYL_02679		Putative amino acid transporter	E	0.5	70	0.05	1.5	10	
SC#488	SXYL_00012		Homoserine O-acetyltransferase	E	0.6	40	0.02	0.5	70	0.04
SC#63	SXYL_00377	<i>dapE</i>	Probable succinyl-diaminopimelate desuccinylase	E	2.3	78	0.15			
SC#634	SXYL_00290	<i>ureD</i>	Urease accessory protein UreD	E	3.0	90	0.77			
SC#635	SXYL_00291	<i>ureG</i>	Urease accessory protein UreG	E	3.0	71	0.30			
SC#636	SXYL_00294	<i>ureC</i>	Urease subunit alpha	E	3.3	80	0.19			
SC#638	SXYL_00296	<i>ureA</i>	Urease gamma subunit	E	3.1	100	0.06			
SC#674	SXYL_00163		Sodium:alanine symporter family protein	E				2.6	100	0.56
SC#738	SXYL_00238	<i>rocDI</i>	Ornithine aminotransferase I	E	0.6	80	0.05			
SC#739	SXYL_00239	<i>argC</i>	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	E	0.6	90	0.05			
SC#740	SXYL_00241	<i>argB</i>	Acetylglutamate kinase	E	0.6	67	0.06			
SC#762	SXYL_00292	<i>ureF</i>	Urease accessory protein UreF	E	2.7	100	0.19			
SC#763	SXYL_00293	<i>ureE</i>	Urease accessory protein ureE	E	2.6	67	0.12			
SC#781	SXYL_00488	<i>opuCA</i>	Glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter	E	0.3	90	0.01	1.6	60	0.07
SC#782	SXYL_00489	<i>opuCB</i>	ABC-type proline glycine betaine transport system permease component	E	0.3	88	0.01	1.9	50	0.06
SC#784	SXYL_00491	<i>opuCD</i>	ABC-type proline glycine betaine transport system permease component	E	0.3	100	0.02	2.0	88	0.16
SC#864	SXYL_00614	<i>hutG</i>	Formimidoylglutamate	E	1.9	80	0.11	1.5	30	0.06
SC#915	SXYL_00663		Putative uncharacterized protein	E	0.8	100				
SC#1024	SXYL_00794	<i>deoD</i>	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type	F	2.4	89	0.24	1.5	33	0.02
SC#1033	SXYL_00803	<i>coaW</i>	Type II pantothenate kinase	F	1.6	100	0.03			
SC#1423	SXYL_01268	<i>comEA</i>	Competence protein ComEA	F	1.5	86	0.08			
SC#1827	SXYL_01684	<i>pyrE</i>	Orotate phosphoribosyltransferase	F	0.6	100	0.03	0.5	100	0.03
SC#1952	SXYL_01831	<i>mntH</i>	Divalent metal cation transporter MntH	F	1.5	70	0.07	2.3	80	0.29
SC#213	SXYL_02435	<i>purR</i>	Pur operon repressor	F	0.7	56	0.03	1.5	67	0.09
SC#2224	SXYL_02117	<i>nrpF</i>	Ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain	F	1.7	50	0.04	3.7	80	0.40
SC#2226	SXYL_02119	<i>nrpI</i>	Protein NrdI	F	1.6	80	0.10	3.1	80	0.04
SC#226	SXYL_02450		Arginine/lysine/ornithine decarboxylase	F	0.7	75	0.06	1.4	13	
SC#2411	SXYL_02301		Putative deoxyadenosine kinase	F	0.7	100	0.06			
SC#2587	SXYL_00149		Truncated anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	F				0.3	100	0.10
SC#2588	SXYL_00150	<i>nrpG</i>	Anaerobic ribonucleotide reductase activating protein	F				0.3	100	0.05
SC#286	SXYL_02520	<i>guaB</i>	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	F				1.5	100	0.06
SC#662	SXYL_00148		Truncated anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	F				0.3	100	0.07
SC#111	SXYL_00426	<i>fbp</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase	G	1.8	80	0.18			
SC#1341	SXYL_01179	<i>gapA2</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	G				0.2	80	0.02
SC#1500	SXYL_01351	<i>malA</i>	Alpha-D-1,4-glucosidase	G	1.9	70	0.14			
SC#1606	SXYL_01454		Xylose isomerase-like protein	G				0.5	80	0.15
SC#1668	SXYL_01518	<i>rbsB</i>	Ribose ABC transporter substrate-binding protein	G	2.2	80	0.13			
SC#1669	SXYL_01519	<i>rbsC</i>	Ribose ABC transporter permease	G	2.3	100	0.06			
SC#1671	SXYL_01521	<i>rbsD</i>	D-ribose pyranase	G	2.1	100	0.17			

SC#193	SXYL_02580		Gluconate permease	G	2.7	90	0.40	1.6	20	0.03
SC#2075	SXYL_01960	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	G	2.2	67	0.26			
SC#2255	SXYL_02147	<i>nagA</i>	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	G	1.6	90	0.10			
SC#2257	SXYL_02149	<i>fruK</i>	Tagatose-6-phosphate kinase	G	0.6	90	0.03			
SC#2365	SXYL_02255		Phosphotransferase system (PTS) maltose-specific enzyme IIBC component	G	2.3	89	0.23			
SC#2381	SXYL_02271	<i>proP</i>	Putative proline/betaine transporter	G	0.3	80	0.04			
SC#2451	SXYL_02343		2-keto-3-deoxygluconate kinase	G	0.7	50	0.03	0.5	90	0.03
SC#2595	SXYL_00253		PTS system, glucose-specific IIBC component	G	0.5	90	0.06	0.6	30	0.03
SC#2742	SXYL_01542	<i>tkl</i>	Transketolase	G	1.9	67	0.07	1.5	22	0.13
SC#338	SXYL_02582		6-phosphogluconate dehydrogenase	G	2.0	89	0.07			
SC#47	SXYL_00361	<i>drp35</i>	Lactonase drp35	G	2.0	100	0.19			
SC#510	SXYL_00039	<i>iolJ</i>	Fructose-bisphosphate aldolase, class II	G				1.9	90	0.04
SC#560	SXYL_00101		Short chain dehydrogenase	G	2.9	89	0.62			
SC#627	SXYL_00278		PTS system, fructose-specific IIBC components	G	3.4	90	0.29			
SC#723	SXYL_00221	<i>fda</i>	Fructose-bisphosphate aldolase class I	G	2.5	70	0.21	1.6	20	0.05
SC#758	SXYL_00279	<i>manA1</i>	Mannose-6-phosphate isomerase, class I	G	3.3	80	0.14			
SC#877	SXYL_00626		PTS system arbutin-like IIBC component	G	1.5	70	0.10			
SC#926	SXYL_00674	<i>galT</i>	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	G	0.7	70	0.01	1.3	20	0.01
		<i>panDtransfer RNA-Leu</i>	Aspartate 1-decarboxylase	H	0.5	100	0.04			
SC#1179	SXYL_01002		S-adenosylmethionine synthetase	H	0.5	100	0.03	0.4	100	0.05
SC#1245	SXYL_01084	<i>metK</i>	Phosphoglycerate dehydrogenase	H				0.5	67	0.03
SC#1304	SXYL_01140	<i>serA</i>	Probable tRNA sulfurtransferase	H						
SC#1312	SXYL_01149	<i>thiI</i>	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase	H	0.7	70	0.05			
SC#164	SXYL_02414	<i>folK</i>	Dihydropterolate synthase	H	1.4	75	0.13			
SC#197	SXYL_02416	<i>folP</i>	Bifunctional protein FolD	H	1.7	80	0.09			
SC#1993	SXYL_01872	<i>folD</i>	Pyridoxal biosynthesis lyase PdxS	H	2.4	80	0.11	1.4	10	
SC#2510	SXYL_02402	<i>pdxS</i>	Dihydroneopterin aldolase	H				2.4	70	0.22
SC#2824	SXYL_02415	<i>folB</i>	Biotin synthetase	H	1.7	100	0.04	1.3	20	
SC#401	SXYL_02609	<i>bioB</i>	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase"	H				0.4	70	0.05
SC#678	SXYL_00168	<i>panB</i>	Molybdenum cofactor biosynthesis protein B	H	1.7	80	0.15	1.4	20	0.08
SC#933	SXYL_00680	<i>moaB</i>	Molybdopterin biosynthesis protein moeA	H	1.6	100	0.15	1.3	17	
SC#935	SXYL_00682	<i>moeA</i>	Putative acyl-CoA thioester hydrolase	I	1.3	20	0.03	1.7	70	0.10
SC#1161	SXYL_00958		3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	I	1.7	100	0.03			
SC#1797	SXYL_01654	<i>fabG</i>	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	I	0.7	44	0.04	0.6	89	0.04
SC#1798	SXYL_01655	<i>fabD</i>	Phosphate acyltransferase	I	0.6	100	0.03	0.7	56	0.05
SC#1799	SXYL_01656	<i>plsX</i>	Lipoate-protein ligase A family protein	I	0.6	90	0.01	0.6	60	0.03
SC#2022	SXYL_01905		Putative acetyl-CoA C-acetyltransferase vraB	I	1.9	75	0.18			
SC#2384	SXYL_02274	<i>vraB</i>	Oxidoreductase domain-containing protein	I	0.7	20	0.02	0.6	80	0.02
SC#2531	SXYL_01457		Oxidoreductase domain-containing protein	I				0.5	70	0.04
SC#2532	SXYL_01456		Cardiolipin synthetase 1	I				0.5	89	0.07
SC#2592	SXYL_00215	<i>clsI</i>	Acetate-CoA ligase	I	0.4	100	0.02			
SC#408	SXYL_02616		3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	I	2.1	90	0.18	1.7	50	0.07
SC#44	SXYL_00358	<i>mvaS</i>	Uncharacterized protein	I	1.9	80	0.18			
SC#59	SXYL_00373		Putative esterase	I	1.4	20		0.6	80	0.03
SC#62	SXYL_00376		2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase	I	1.6	70	0.16	0.6	50	0.06
SC#71	SXYL_00385	<i>ispD</i>	Tributylin esterase	I	1.5	89	0.07	0.5	100	0.03
SC#785	SXYL_00492	<i>estA</i>	Translation initiation factor IF-3	I	0.5	78	0.08	1.8	11	
SC#1348	SXYL_01186	<i>infC</i>	Glycine--tRNA ligase	J	0.5	86	0.01			
SC#1447	SXYL_01291	<i>glyQS</i>	30S ribosomal protein S1	J	0.6	80	0.08			
SC#1524	SXYL_01375	<i>rpsA</i>	tRNA dimethylallyltransferase	J	1.6	67	0.10			
SC#1724	SXYL_01574	<i>miaA</i>	Putative ribosomal protein	J	1.4	75	0.06			
SC#1765	SXYL_01616		Methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil-5-)-methyltransferase TrmFO	J	0.5	67	0.00			
SC#1781	SXYL_01633	<i>trmFO</i>	Peptide chain release factor 3	J	0.7	70	0.02			
SC#2027	SXYL_01912	<i>prfC</i>	50S ribosomal protein L25	J				1.6	78	0.09
SC#209	SXYL_02429	<i>rplY</i>	Truncated peptide chain release factor 2	J	0.5	75	0.04			
SC#2200	SXYL_02093	<i>prfB</i>	7-cyano-7-deazaguanine synthase	J	1.5	70	0.05			
SC#2246	SXYL_02139	<i>queC</i>	Arginyl-tRNA synthetase	J	0.5	86	0.02	0.5	86	0.02
SC#2352	SXYL_02242	<i>argS</i>	50S ribosomal protein L7/L12	J	0.6	78	0.01			
SC#2489	SXYL_02380	<i>rplL</i>	50S ribosomal protein L11	J	0.5	75	0.01			
SC#2492	SXYL_02383	<i>rplK</i>	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit	J	0.5	100	0.02			
SC#2525	SXYL_01803	<i>pheT</i>	30S ribosomal protein S10	J	0.6	90	0.02	0.7	80	0.03
SC#2655	SXYL_00704	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S5	J	0.6	100	0.02			
SC#2656	SXYL_00722	<i>rpsE</i>	50S ribosomal protein L30	J	0.5	86	0.02			
SC#2657	SXYL_00723	<i>rpmD</i>	30S ribosomal protein S13	J	0.5	100	0.02			
SC#2658	SXYL_00729	<i>rpsM</i>		J	0.5	75	0.01			

SC#2659	SXYL_00732	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	J	0.6	100	0.01			
SC#2660	SXYL_00737	<i>rplM</i>	50S ribosomal protein L13	J	0.6	67	0.02			
SC#2711	SXYL_01213	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	J	0.6	100	0.01			
SC#2751	SXYL_01627	<i>tsf</i>	Elongation factor Ts	J	0.6	33	0.07	0.6	89	0.04
SC#2752	SXYL_01628	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	J	0.5	89	0.04	0.5	89	0.02
SC#2818	SXYL_02381	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	J	0.5	100	0.01			
SC#327	SXYL_02569	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	J	0.6	100	0.01			
SC#490	SXYL_00015	<i>rplI</i>	50S ribosomal protein L9	J	0.6	75	0.01	1.6	25	
SC#956	SXYL_00705	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	J	0.5	88	0.02			
SC#957	SXYL_00706	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	J	0.5	100	0.04			
SC#958	SXYL_00707	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	J	0.5	75	0.02			
SC#959	SXYL_00708	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	J	0.5	100	0.01			
SC#960	SXYL_00709	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	J	0.5	100	0.01			
SC#961	SXYL_00710	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	J	0.5	75	0.04			
SC#962	SXYL_00711	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	J	0.5	88	0.04			
SC#963	SXYL_00712	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	J	0.5	100	0.01			
SC#964	SXYL_00713	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	J	0.4	100	0.02			
SC#966	SXYL_00715	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	J	0.5	75	0.01			
SC#967	SXYL_00716	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	J	0.5	75	0.03			
SC#968	SXYL_00717	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	J	0.4	71	0.02			
SC#970	SXYL_00719	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	J	0.4	100	0.03			
SC#971	SXYL_00720	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	J	0.4	83	0.02			
SC#972	SXYL_00721	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	J	0.4	75	0.01			
SC#973	SXYL_00724	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	J	0.6	100	0.04			
SC#977	SXYL_00728	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	J	0.5	100				
SC#978	SXYL_00730	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	J	0.5	80	0.02			
SC#984	SXYL_00736	<i>truA</i>	tRNA pseudouridine synthase A	J	0.5	78	0.03	1.4	11	
SC#1013	SXYL_00784	<i>czrA</i>	Zinc and cobalt transport repressor CzrA	K				2.1	75	0.08
SC#1110	SXYL_00904		Transcriptional regulator, GntR family	K	0.6	67	0.04			
SC#1178	SXYL_00975		Peroxide-responsive repressor PerR	K	2.0	100	0.13			
SC#1194	SXYL_01018		Putative transcriptional regulator	K	0.6	89	0.02	1.5	11	
SC#1293	SXYL_01129	<i>ccpA</i>	Catabolite control protein A	K	1.8	70	0.09	0.8	10	
SC#1406	SXYL_01250	<i>greA</i>	Transcription elongation factor GreA	K				0.5	67	0.04
SC#1430	SXYL_01275	<i>hrcA</i>	Heat-inducible transcription repressor HrcA	K	0.7	70	0.05			
SC#1499	SXYL_01350	<i>malR</i>	HTH-type transcriptional regulator malR	K	2.0	70	0.13			
SC#1519	SXYL_01370	<i>recQ2</i>	ATP-dependent DNA helicase RecQ	K	1.5	78	0.09			
SC#1655	SXYL_01507		Transcriptional regulator, ArsR family	K				0.6	67	0.04
SC#1672	SXYL_01522	<i>rbsR</i>	Ribose operon repressor	K	2.4	90	0.14			
SC#1800	SXYL_01657	<i>fapR</i>	Transcription factor FapR	K	0.6	100	0.02	0.7	60	0.02
SC#1817	SXYL_01674		Putative acetyltransferase	K	1.4	75	0.07			
SC#1928	SXYL_01785		Phage repressor-like protein	K	0.6	67	0.04			
SC#2003	SXYL_01882		Putative transcriptional regulator	K	0.4	67	0.04	0.4	56	0.02
SC#2005	SXYL_01884		UPF0039 protein	K	2.7	100	0.36			
SC#219	SXYL_02442	<i>rsmI</i>	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase I	K	0.8	70	0.04	1.3	10	
SC#2301	SXYL_02192	<i>graR</i>	Response regulator protein graR	K	0.5	75	0.02			
SC#2364	SXYL_02254		RpiR family transcriptional regulator	K	1.7	67	0.16			
SC#2443	SXYL_02334		Transcriptional regulator, DeoR family	K				0.5	80	0.05
SC#2623	SXYL_00531		Acetyltransferase	K	2.0	100	0.33			
SC#292	SXYL_02530		Perfringolysin O regulator protein	K	0.5	80	0.05			
SC#30	SXYL_00342		Uncharacterized membrane protein	K	0.4	100	0.13	0.6	60	0.05
SC#411	SXYL_02620		MarR family transcriptional regulator	K	1.4	80	0.05	1.5	80	0.06
SC#456	SXYL_02669		LysR-family transcriptional regulator	K	1.4	78	0.11	1.5	78	0.09
SC#468	SXYL_02683		Transcriptional regulator, MerR family	K				1.6	75	0.11
SC#533	SXYL_00067	<i>cobB</i>	NAD-dependent protein deacetylase	K	1.7	89	0.13	1.6	78	0.08
SC#61	SXYL_00375		Putative acetyltransferase	K				0.5	100	0.04
SC#653	SXYL_00315		TetR family transcriptional regulator	K	1.7	71	0.05			
SC#694	SXYL_00186		Transcriptional regulator, PadR-like family	K	1.5	60	0.05	2.2	80	0.09
SC#695	SXYL_00188		Truncated NADH-dependent flavin oxidoreductase	K	1.4	50	0.06	1.6	75	0.11
SC#79	SXYL_00393		Putative transcriptional regulator	K	1.7	89	0.12	2.2	100	0.06
SC#796	SXYL_00503		Putative acetyltransferase	K	2.1	71	0.21			
SC#807	SXYL_00557		TetR family transcriptional regulator	K	0.7	80	0.04			
SC#821	SXYL_00571		Putative GNAT-family acetyltransferase	K	2.6	100	0.30	1.7	80	0.06
SC#851	SXYL_00601		Transcriptional regulator, PadR family	K	0.6	100	0.07			
SC#943	SXYL_00690		MarR family transcriptional regulator	K	0.7	80	0.12	1.3	20	
SC#1145	SXYL_00942	<i>dinB</i>	DNA polymerase IV	L	1.7	90	0.14			

SC#1146	SXYL_00943		Putative exonuclease	L	1.6	83	0.08			
SC#1400	SXYL_01244		Putative Holliday junction resolvase	L				0.6	67	0.02
SC#1455	SXYL_01299	<i>nfo</i>	Probable endonuclease 4	L	0.6	75	0.04			
SC#1546	SXYL_01397	<i>nth</i>	Endonuclease III	L	1.4	86	0.07			
SC#1554	SXYL_01406	<i>rarD</i>	RarD protein	L	0.6	90	0.04			
SC#1680	SXYL_01530	<i>parE</i>	DNA topoisomerase 4 subunit B	L				1.5	67	0.10
SC#2506	SXYL_02398		Putative uncharacterized protein	L				2.6	71	0.16
SC#2518	SXYL_01796	<i>uvrC</i>	UvrABC system protein C	L	1.8	100	0.21	1.4	44	0.04
SC#2524	SXYL_01802	<i>rnhC</i>	Ribonuclease HIII	L	0.6	80	0.05			
SC#479	SXYL_00001	<i>dnaA</i>	Chromosomal replication initiator protein dnaA	L	0.7	89	0.02	1.8	100	0.09
SC#483	SXYL_00006	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	L	0.7	40	0.01	1.6	70	0.06
SC#829	SXYL_00580		Putative transposase	L	0.8	100				
SC#855	SXYL_00605		Putative 3-methyladenine DNA glycosylase	L				0.6	78	0.08
SC#954	SXYL_00701	<i>topB</i>	DNA topoisomerase III	L	0.7	89	0.03	1.4	67	0.07
SC#117	SXYL_00432		Membrane protein	M	0.4	90	0.05			
SC#1234	SXYL_01073		Putative membrane protein	M	0.5	67	0.03	0.6	17	
SC#1255	SXYL_01094		Beta-N-acetylglucosamidase	M	0.7	44	0.03	0.5	89	0.04
SC#1273	SXYL_01111		Putative membrane protein involved in the export of teichoic acid	M	0.5	80	0.04	0.6	20	0.02
SC#1360	SXYL_01200		Putative membrane protein	M	1.9	80	0.19			
SC#1460	SXYL_01304	<i>pbp3</i>	Penicillin-binding protein 3	M				0.7	80	0.04
SC#1658	SXYL_01509		Glycosyltransferase	M	0.4	80	0.12	0.6	30	0.02
SC#1836	SXYL_01693	<i>lspA</i>	Lipoprotein signal peptidase	M	0.5	83	0.01			
SC#2101	SXYL_01987	<i>dltD</i>	D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis protein DltD	M	0.2	100	0.02	0.7	38	0.04
SC#2102	SXYL_01988	<i>dltC</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 2	M	0.2	100	0.01			
SC#2103	SXYL_01989	<i>dltB</i>	D-alanyl transfer protein DltB	M	0.3	90	0.02	0.7	20	0.04
SC#2104	SXYL_01990	<i>dltA</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	M	0.3	100	0.03	0.7	11	
SC#2675	SXYL_00856	<i>alr1</i>	Alanine racemase 1	M	1.4	70	0.05			
SC#2740	SXYL_01536	<i>mscL</i>	Large-conductance mechanosensitive channel	M	0.7	20		0.7	80	0.05
SC#2749	SXYL_01622		Putative zinc metalloprotease	M	0.7	78	0.04			
SC#2769	SXYL_01705	<i>murD</i>	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	M	0.7	80	0.04	0.8	10	
SC#369	SXYL_02673		Putative acyltransferase	M	0.7	78	0.03	1.5	44	0.09
SC#543	SXYL_00080		UPF0324 membrane protein	M				1.7	90	0.34
SC#551	SXYL_00090		Transporter, putative	M	0.5	100	0.03	1.5	11	
SC#728	SXYL_00227	<i>tagF</i>	Teichoic acid biosynthesis protein F	M	0.3	67	0.03			
SC#73	SXYL_00387		Putative glycosyl glycerophosphate transferase involved in teichoic acid biosynthesis	M	1.4	70	0.06	0.7	70	0.03
SC#797	SXYL_00504		Membrane protein insertase, YidC/Oxa1 family	M	0.7	80	0.03			
SC#798	SXYL_00505		Membrane protein insertase, YidC/Oxa1 family	M	0.7	67	0.04			
SC#88	SXYL_00402	<i>srtA</i>	Sortase	M	0.6	88	0.03	0.7	75	0.03
SC#898	SXYL_00647		Glucosaminidase	M	0.6	100	0.02			
SC#1104	SXYL_00898	<i>groS</i>	10 kDa chaperonin	O	0.6	33		2.0	67	0.02
SC#1667	SXYL_01517	<i>msrA1</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA 1	O	1.5	67	0.09	0.7	17	
SC#1699	SXYL_01551	<i>katB</i>	Catalase B	O	2.3	67	0.12			
SC#1723	SXYL_01572	<i>bsaA</i>	Glutathione peroxidase	O	2.2	100	0.17			
SC#1738	SXYL_01588		Putative uncharacterized protein	O	0.6	67	0.05	0.5	67	0.04
SC#2190	SXYL_02083	<i>trxB</i>	Thioredoxin reductase	O	1.6	90	0.10			
SC#2504	SXYL_02396	<i>clpC</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	O				2.1	80	0.16
SC#2640	SXYL_00548		Heat shock protein Hsp20	O	0.5	75	0.04	2.0	50	0.11
SC#273	SXYL_02505	<i>katA</i>	Catalase A	O	0.3	78	0.09	0.6	78	0.08
SC#2798	SXYL_02016		Putative thioredoxin	O	1.8	100	0.04	0.6	50	0.03
SC#2825	SXYL_02418	<i>hslO</i>	33 kDa chaperonin	O	1.9	90	0.13			
SC#295	SXYL_02533	<i>katC</i>	Catalase C	O	2.3	100	0.16	1.7	20	0.05
SC#296	SXYL_02534	<i>ahpC</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	O				2.0	75	0.06
SC#795	SXYL_00502	<i>pcp</i>	Pyrrolidone-carboxylate peptidase	O	1.7	75	0.23			
SC#820	SXYL_00570		Ferredoxin--NADP reductase	O	2.4	100	0.22	1.9	90	0.11
SC#184	SXYL_02529	<i>sdaAB1</i>	L-serine dehydratase subunit beta	P	0.5	100	0.01			
SC#2036	SXYL_01923		Divalent cation transporter MgtE	P	0.7	90	0.03			
SC#2091	SXYL_01976	<i>mnhG1</i>	Na(+)/H(+) antiporter subunit G1	P				1.4	80	0.03
SC#2215	SXYL_02108		Uncharacterized protein	P	0.7	63	0.04	0.6	88	0.03
SC#2220	SXYL_02113	<i>sstD</i>	Lipoprotein SstD	P	2.5	88	0.29	3.8	88	1.19
SC#2221	SXYL_02114	<i>sstC</i>	Iron compound ABC transporter, ATP-binding protein SstC	P	2.5	100	0.20	3.9	100	0.62
SC#2222	SXYL_02115	<i>sstB</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein SstB	P	3.1	90	0.26	5.3	90	0.58
SC#2223	SXYL_02116	<i>sstA</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein SstA	P	2.8	90	0.68	3.3	90	1.01
SC#2310	SXYL_02201	<i>fhuG</i>	ABC-type cobalamin/Fe3+-siderophores transport systems, permease components	P	2.2	90	0.27	1.8	70	0.13
SC#2311	SXYL_02202	<i>fhuB</i>	ABC-type cobalamin Fe3+-siderophores transport system permease component	P	2.6	100	0.11	1.8	70	0.10
SC#2312	SXYL_02203	<i>fhuC</i>	ABC-type cobalamin Fe3+-siderophores transport system ATPase component	P	2.7	90	0.11			

SC#2537	SXYL_00755	<i>isdG</i>	Heme-degrading monooxygenase	P	2.0	100	0.13			
SC#2539	SXYL_00753	<i>htsC</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein	P	1.7	78	0.07	1.9	89	0.18
SC#2661	SXYL_00751	<i>htsA</i>	Iron compound ABC transporter, iron compound-binding protein	P	3.1	90	0.53	2.5	90	0.57
SC#2662	SXYL_00752	<i>htsB</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein	P	1.7	100	0.11	2.0	90	0.31
SC#2839	SXYL_02646		Sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component	P				3.1	100	0.17
SC#291	SXYL_02528	<i>sdaAA1</i>	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit	P	0.6	70	0.08			
SC#445	SXYL_02657		Magnesium transporter	P	1.6	40	0.05	2.5	80	0.23
SC#466	SXYL_02681	<i>fhuD2</i>	Iron(3+)-hydroxamate-binding protein	P	2.0	67	0.41	1.8	78	0.43
SC#76	SXYL_00390		ABC-type cobalt transport system permease component	P	1.3	33	0.07	1.5	89	0.11
SC#886	SXYL_00635	<i>phoB</i>	Alkaline phosphatase III	P	0.8	11		0.7	78	0.04
SC#919	SXYL_00667	<i>fhuD1</i>	Iron(3+)-hydroxamate-binding protein	P	2.3	90	0.40	1.8	70	0.25
SC#981	SXYL_00733	<i>ecfA1</i>	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA1	P	0.5	90	0.02	1.3	30	0.05
SC#982	SXYL_00734	<i>ecfA2</i>	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcfA2	P	0.5	90	0.01	1.5	10	
SC#983	SXYL_00735	<i>ecfT</i>	Energy-coupling factor transporter transmembrane protein EcfT	P	0.5	90	0.01	1.5	30	0.05
SC#994	SXYL_00747	<i>sfaD</i>	Siderophore biosynthesis protein, lucA/lucC family	P	2.4	78	0.36	2.0	67	0.31
SC#995	SXYL_00748	<i>sfaA</i>	Transporter SfaA	P	1.9	90	0.40	1.6	70	0.23
SC#996	SXYL_00749	<i>sfaB</i>	Siderophore biosynthesis protein, lucA/lucC family	P	1.7	80	0.09	1.4	60	0.11
SC#997	SXYL_00750	<i>sfaC</i>	amino acid racemase	P	1.5	90	0.10	1.3	70	0.04
SC#1233	SXYL_01072	<i>butA</i>	Acetoin(diacetyl) reductase	Q	2.5	90	0.14			
SC#1294	SXYL_01130	<i>acuC</i>	Acetoin utilization protein AcuC	Q	2.0	90	0.16			
SC#1008	SXYL_00779		Putative ABC transporter ATP-binding protein	R	2.0	100	0.13			
SC#107	SXYL_00422		Putative amidase related to nicotinamidase	R	1.4	86	0.06			
SC#11	SXYL_00325	<i>ldh3</i>	D-lactate dehydrogenase	R				0.4	80	0.07
SC#1111	SXYL_00905		ABC transporter, ATP-binding protein	R	0.6	100	0.03			
SC#1113	SXYL_00907		ABC transporter ATP-binding protein	R	0.7	100	0.05			
SC#1126	SXYL_00919		Putative nicotinamidase	R				1.6	75	0.15
SC#1139	SXYL_00935	<i>putP2</i>	Sodium/proline symporter 2	R	0.6	10		0.5	90	0.03
SC#114	SXYL_00429		Putative permease of the major facilitator superfamily	R	2.5	90	0.21	0.2	90	0.01
SC#12	SXYL_00326	<i>copZ</i>	Copper chaperone CopZ	R	1.7	100	0.02			
SC#1246	SXYL_01086		Aldo keto reductase family protein	R	3.5	78	0.38	1.4	44	0.04
SC#1250	SXYL_01089	<i>tal</i>	Transaldolase	R	2.2	78	0.16			
SC#1263	SXYL_01101	<i>putA</i>	Proline dehydrogenase	R				0.4	90	0.08
SC#1280	SXYL_01118		Putative Zn-dependent hydrolase	R	1.6	70	0.09			
SC#131	SXYL_00445	<i>gusA</i>	Beta-glucuronidase	R				0.6	80	0.04
SC#1310	SXYL_01146		GAF domain protein	R	2.3	100	0.30			
SC#132	SXYL_00446		Beta-N-acetylglucosaminidase/beta-glucosidase	R	1.9	90	0.18			
SC#1322	SXYL_01159		Cytoplasmic copper homeostasis protein CutC	R	1.8	71	0.12			
SC#1392	SXYL_01236		Putative oxidoreductase	R	2.5	90	0.19			
SC#14	SXYL_00328		Sulfate permease	R	0.5	70	0.08			
SC#1408	SXYL_01252		Allophanate hydrolase subunit 2	R	2.7	90	0.33	0.5	50	0.05
SC#1418	SXYL_01263	<i>nadD</i>	Probable nicotinate-nucleotide adenyltransferase	R	0.6	71	0.01			
SC#1456	SXYL_01300		Mn/Zn ABC transporter ATP-binding protein	R	0.7	30	0.04	0.5	90	0.03
SC#1457	SXYL_01301		Mn/Zn ABC transport system permease component	R	0.7	40	0.01	0.6	80	0.04
SC#15	SXYL_00329		ABC-type antimicrobial peptide transport system ATPase component	R	0.6	100	0.06			
SC#1505	SXYL_01356		Short chain dehydrogenase	R	1.4	78	0.07			
SC#1550	SXYL_01400	<i>recU</i>	Holliday junction resolvase RecU	R	0.6	88	0.03			
SC#1585	SXYL_01435		Putative prophage antirepressor	R	0.5	88	0.03	1.4	13	
SC#1598	SXYL_01447		Phage like protein	R				0.4	83	0.04
SC#1630	SXYL_01481		Aldo keto reductase family protein	R	1.9	80	0.08			
SC#1637	SXYL_01489		Oligoendopeptidase F	R	1.8	90	0.13			
SC#1661	SXYL_01512		Putative phosphoglycerate dehydrogenase	R				2.5	100	0.14
SC#1663	SXYL_01514		Putative DNA-damage repair protein	R				3.8	80	0.36
SC#1670	SXYL_01520	<i>rbsA</i>	Ribose import ATP-binding protein RbsA	R	2.1	70	0.18			
SC#1674	SXYL_01524	<i>mprF</i>	Phosphatidylglycerol lysyltransferase	R	0.7	30	0.02	0.6	70	0.04
SC#1716	SXYL_01566		Organic hydroperoxide resistance protein-like 2	R	0.5	50	0.03	0.3	67	0.04
SC#1722	SXYL_01571	<i>hflX</i>	GTPase HflX	R	1.5	70	0.14			
SC#1725	SXYL_01575		Putative lysophospholipase	R	1.7	80	0.17			
SC#1748	SXYL_01598	<i>cinA</i>	Putative competence-damage inducible protein	R	2.3	80	0.14			
SC#1756	SXYL_01607		Ribonuclease J 2	R				0.7	70	0.03
SC#1767	SXYL_01618	<i>nusA</i>	Transcription elongation protein NusA	R	0.5	78	0.04			
SC#1801	SXYL_01658		Zinc metalloprotease	R	0.5	90	0.03			
SC#1813	SXYL_01670	<i>rlmN</i>	Probable dual-specificity RNA methyltransferase RlmN	R	0.6	78	0.01			
SC#1823	SXYL_01680		Fibronectin/fibrinogen binding protein	R	1.4	10		1.8	80	0.09
SC#1837	SXYL_01694		Glyoxalase family protein	R	0.5	89	0.01			
SC#1842	SXYL_01698		Putative membrane protein	R				0.7	67	0.00

SC#188	SXYL_02553		Putative Trk-type K+ transport system membrane component	R	1.5	60	0.12	1.7	80	0.12
SC#1906	SXYL_01763		Putative uncharacterized protein	R	0.5	100	0.04			
SC#1908	SXYL_01765		Uncharacterized phage related protein	R	0.5	67	0.03			
SC#1913	SXYL_01770		Uncharacterized phage protein	R	0.5	100	0.02			
SC#1914	SXYL_01771		Endodeoxyribonuclease RusA	R	0.4	100	0.09			
SC#1917	SXYL_01774		Phage DnaC-like protein	R	0.4	75	0.07			
SC#1919	SXYL_01776		Putative phage protein	R	0.4	75	0.09			
SC#1920	SXYL_01777	<i>ssb2</i>	Single-stranded DNA-binding protein	R	0.5	86	0.03			
SC#1922	SXYL_01779		Phage-related protein	R	0.4	100	0.13			
SC#1923	SXYL_01780		Uncharacterized protein	R	0.4	67	0.11			
SC#1924	SXYL_01781		Uncharacterized protein	R	0.6	100	0.04			
SC#1926	SXYL_01783		Phage antirepressor protein	R	0.4	78	0.04			
SC#1929	SXYL_01786		Uncharacterized protein	R	0.6	86	0.04	1.4	29	0.04
SC#1999	SXYL_01879		Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	R	2.5	90	0.17			
SC#2055	SXYL_01942		Major facilitator superfamily permease	R	0.7	75	0.03	0.7	13	
SC#2096	SXYL_01982		HesB-like domain protein	R	1.8	80	0.07			
SC#211	SXYL_02431	<i>glmU</i>	Bifunctional protein glmU	R	0.7	78	0.02	0.8	33	0.03
SC#2127	SXYL_02013		Lipoprotein	R	0.7	67	0.03	0.3	100	0.16
SC#2156	SXYL_02050	<i>lytN</i>	Probable cell-wall hydrolase LytN	R	1.4	67	0.04			
SC#2213	SXYL_02106		Putative glycerate kinase	R	1.8	70	0.11			
SC#2247	SXYL_02140	<i>queD</i>	6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase	R	0.4	100	0.01	0.5	100	0.03
SC#2248	SXYL_02141	<i>queE</i>	7-carboxy-7-deazaguanine synthase	R	0.4	100	0.03	0.5	75	0.07
SC#2252	SXYL_02145		Aldo keto reductase family protein	R	2.9	67	0.42			
SC#2299	SXYL_02189		Inorganic phosphate transporter	R				0.5	100	0.04
SC#2358	SXYL_02248		Aldo keto reductase family protein	R	1.9	70	0.18			
SC#2361	SXYL_02251		Gfo/Idh/MocA family oxidoreductase	R	2.3	80	0.18			
SC#2363	SXYL_02253		Gfo/Idh/MocA family oxidoreductase	R	2.1	70	0.19			
SC#2386	SXYL_02276		Malate dehydrogenase	R	2.0	67	0.24	2.1	67	0.11
SC#2408	SXYL_02298	<i>azoI</i>	FMN-dependent NADPH-azoreductase	R				2.0	83	0.04
SC#2409	SXYL_02299		HAD family hydrolase	R				2.2	100	0.11
SC#2414	SXYL_02304		Putative phosphatase	R	1.6	88	0.13			
SC#2418	SXYL_02308		Uncharacterized epimerase/dehydratase	R	1.7	70	0.09			
SC#2428	SXYL_02318		Putative alkylphosphonate uptake protein	R	1.7	67	0.07			
SC#2442	SXYL_02333		Putative permease of the major facilitator superfamily	R				0.3	80	0.03
SC#2445	SXYL_02336		Putative ABC transporter ATP-binding protein	R	2.1	90	0.22			
SC#2447	SXYL_02338	<i>uxuA</i>	Mannonate dehydratase	R				0.5	89	0.01
SC#2448	SXYL_02339	<i>uxaC2</i>	Glucuronate isomerase	R	1.1	20	0.45	0.5	80	0.05
SC#2450	SXYL_02341		C4-dicarboxylate transport system permease small protein	R				0.6	67	0.06
SC#2452	SXYL_02344		2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	R	1.2	38	0.74	0.5	75	0.02
SC#2478	SXYL_02369		Putative kinase	R	1.9	83	0.19			
SC#252	SXYL_02480		Short-chain dehydrogenase	R	1.9	100	0.24			
SC#2591	SXYL_00207	<i>ppsA</i>	Pyruvate phosphate dikinase	R				0.1	70	0.03
SC#2596	SXYL_00280		Putative transcriptional regulator	R	3.3	90	0.27			
SC#2599	SXYL_00352		Putative metal-dependent amidase	R	1.6	80	0.12	1.5	50	0.09
SC#2608	SXYL_00516		Putative permease of the major facilitator superfamily	R	0.6	70	0.03	0.6	40	0.03
SC#264	SXYL_02494		Uncharacterized protein	R				1.4	80	0.06
SC#2647	SXYL_00572		Major facilitator superfamily protein	R	2.0	90	0.15			
SC#2694	SXYL_01036		ABC transporter, ATP-binding subunit	R	0.7	78	0.02			
SC#2724	SXYL_01324		Xaa-Pro dipeptidase	R	1.7	90	0.09			
SC#278	SXYL_02511		Putative permease of the major facilitator superfamily	R	0.4	80	0.07			
SC#2784	SXYL_01874		Putative exported protein	R	1.7	100	0.09			
SC#2796	SXYL_02014		ABC transporter, permease protein	R	0.6	75	0.02	0.2	100	0.06
SC#2797	SXYL_02015	<i>metN2</i>	Methionine import ATP-binding protein metN 2	R	0.7	56	0.03	0.3	100	0.03
SC#2813	SXYL_02337		D-mannonate oxidoreductase	R				0.5	89	0.04
SC#2834	SXYL_02605		Putative permease protein	R	0.6	70	0.02			
SC#2840	SXYL_02658		Metal cation ABC transporter	R				2.3	88	0.34
SC#311	SXYL_02552		Putative Trk-type K+ transport system membrane component	R	1.6	70	0.21	1.6	50	0.11
SC#318	SXYL_02560		Putative extracellular amidase	R	1.8	78	0.07			
SC#322	SXYL_02564		Thioesterase	R	0.4	86	0.03	1.6	71	0.06
SC#323	SXYL_02565		4 -phosphopantetheinyl transferase superfamily protein	R	0.4	100	0.06	1.7	86	0.08
SC#337	SXYL_02581		Putative xylose isomerase	R	2.0	75	0.13			
SC#340	SXYL_02583		NADP-dependent alcohol dehydrogenase	R	3.3	100	0.33	2.0	50	0.12
SC#379	SXYL_00038	<i>iolG</i>	Myo-inositol 2-dehydrogenase	R				1.9	90	0.07
SC#412	SXYL_02621	<i>maoC</i>	Possible acyl dehydratase MaoC	R	1.5	75	0.02	1.8	100	0.03
SC#448	SXYL_02659	<i>mtsC</i>	Metal ion ABC transporter, permease protein	R				2.8	80	0.12

SC#449	SXYL_02660		Putative manganese transport system ATP-binding protein MntA	R				2.2	90	0.42
SC#455	SXYL_02668		HAD family hydrolase	R	2.0	100	0.23			
SC#465	SXYL_02680		Aldo keto reductase family protein	R	1.4	33	0.06			
SC#509	SXYL_00037		Sodium:solute symporter family protein	R				1.9	89	0.13
SC#511	SXYL_00040	<i>iolK</i>	4-oxalocrotonate tautomerase homolog	R				1.9	100	0.05
SC#513	SXYL_00042	<i>dltE</i>	Oxidoreductase DltE	R				1.6	80	0.22
SC#532	SXYL_00066		Putative symporter	R	2.4	88	0.40	2.4	88	0.33
SC#56	SXYL_00370		Putative acetyltransferase	R				1.7	80	0.13
SC#581	SXYL_00128		ABC transporter, ATP-binding subunit	R	2.0	75	0.14			
SC#584	SXYL_00131	<i>padA</i>	Phenolic acid decarboxylase	R	1.6	89	0.09	1.6	67	0.07
SC#593	SXYL_00164		Membrane protein	R	0.4	83	0.03	7.8	83	0.73
SC#646	SXYL_00308		HAD family hydrolase	R	1.4	86	0.08	1.4	43	0.05
SC#658	SXYL_00142		Putative sugar kinase	R	1.4	78	0.13	0.7	56	0.01
SC#666	SXYL_00153		Putative FMN reductase	R	1.7	70	0.07	1.6	70	0.04
SC#667	SXYL_00154		Putative oxidoreductase	R				1.8	86	0.25
SC#671	SXYL_00160		Transporter LysE family	R				1.8	67	0.15
SC#693	SXYL_00185	<i>ipdC</i>	Putative indole-3-pyruvate decarboxylase	R	0.5	13		0.4	100	0.10
SC#696	SXYL_00189		Truncated NADH-dependent flavin oxidoreductase	R	1.5	90	0.15			
SC#708	SXYL_00203	<i>kdgT</i>	2-keto-3-deoxygluconate permease	R	1.8	100	0.10	1.7	89	0.06
SC#709	SXYL_00204		Glycerate kinase	R	1.6	30	0.10	0.5	70	0.05
SC#717	SXYL_00214		MFS superfamily transporter	R	1.8	89	0.17	0.5	56	0.03
SC#72	SXYL_00386		Putative zinc-binding dehydrogenase	R	0.4	80	0.08			
SC#731	SXYL_00231		Putative inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	R	1.5	40	0.08	0.6	70	0.02
SC#742	SXYL_00243		Putative FMN reductase NADPH-dependent	R	0.7	78	0.05			
SC#745	SXYL_00247		Transcriptional regulator, IclR family	R	3.3	100	0.63			
SC#747	SXYL_00249		Putative sorbitol dehydrogenase	R	0.7	71	0.03			
SC#748	SXYL_00251		Putative permease of the major facilitator superfamily	R				1.8	70	0.07
SC#757	SXYL_00275		Lipoprotein	R	2.2	90	0.20			
SC#769	SXYL_00476		Glutamate synthase	R	0.5	100	0.07	0.4	100	0.06
SC#779	SXYL_00486	<i>lcdH</i>	L-carnitine dehydrogenase	R				1.7	70	0.04
SC#790	SXYL_00497		Putative permease of the major facilitator superfamily	R	0.1	80	0.01	2.2	40	0.11
SC#80	SXYL_00394		Putative permease of the major facilitator superfamily	R	0.5	90	0.09			
SC#81	SXYL_00395		Putative sugar kinase	R				2.2	70	0.14
SC#810	SXYL_00560		Putative oxidoreductase	R				2.0	80	0.17
SC#82	SXYL_00396		Sorbitol dehydrogenase, putative	R	3.4	78	0.48			
SC#834	SXYL_00585	<i>hrtB</i>	Putative hemin transport system permease protein hrtB	R				1.9	70	0.19
SC#835	SXYL_00586	<i>hrtA</i>	Putative hemin import ATP-binding protein hrtA	R	0.5	100	0.15	0.7	10	
SC#842	SXYL_00592		Uncharacterized protein	R	0.6	67	0.06			
SC#843	SXYL_00593		Putative permease of the major facilitator superfamily	R	0.5	75	0.04	0.7	25	0.04
SC#87	SXYL_00401		Putative acetyltransferase	R	0.5	90	0.10	0.7	70	0.06
SC#9	SXYL_00323	<i>isaA</i>	Probable transglycosylase IsaA	R	1.9	100	0.17	1.6	100	0.14
SC#900	SXYL_00649		D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	R				0.5	89	0.02
SC#901	SXYL_00650		Multidrug resistance protein SMR	R	2.1	100	0.13			
SC#902	SXYL_00651		Multidrug resistance protein SMR	R				1.6	100	0.24
SC#91	SXYL_00405		Putative ROK family protein	R				1.6	100	0.37
SC#93	SXYL_00407		Sodium:solute symporter family protein	R	2.3	70	0.32			
SC#94	SXYL_00408		Putative NADPH-quinone reductase	R				0.5	78	0.02
SC#95	SXYL_00409		HAD family hydrolase	R	2.7	71	0.25	0.7	14	
SC#97	SXYL_00411		Putative glyoxalase bleomycin resistance protein	R	1.7	100	0.24			
SC#987	SXYL_00740		Putative oxidoreductase	R	1.7	90	0.11	2.0	90	0.24
SC#988	SXYL_00741		NADP-dependent oxidoreductase-like protein	R	1.7	78	0.29			
SC#989	SXYL_00742		Putative zinc-binding dehydrogenase	R	3.0	70	0.32			
SC#1001	SXYL_00771		Putative uncharacterized protein	R	2.7	80	0.14			
SC#1006	SXYL_00777	<i>glmS</i>	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing]	S	0.6	78	0.05			
SC#1007	SXYL_00778		Putative uncharacterized protein	S	1.3	20	0.01	0.5	90	0.02
SC#1014	SXYL_00785		NAD-dependent epimerase/dehydratase	S	1.8	100	0.07			
SC#1108	SXYL_00902		Putative uncharacterized protein	S	2.9	88	0.05	1.8	50	0.01
SC#1112	SXYL_00906		Putative membrane protein	S				1.8	100	
SC#1116	SXYL_00910		Putative uncharacterized protein	S	0.6	83	0.03			
SC#1117	SXYL_00911		Putative membrane protein	S	0.7	67	0.02			
SC#1123	SXYL_00916		Putative uncharacterized protein	S				0.7	67	0.03
SC#115	SXYL_00430		Uncharacterized protein	S	1.9	90	0.14			
SC#1184	SXYL_01008		Putative tRNA (cytidine(34)-2'-O)-methyltransferase	S	2.4	75	0.10	0.3	25	
SC#1186	SXYL_01010		Putative membrane protein	S	0.6	67	0.04			
SC#1212	SXYL_01042	<i>transfer RNA-Met</i>	Putative esterase	S				0.7	100	0.03
					1.5	86	0.07			

SC#1238	SXYL_01077	Putative membrane protein	S	1.9	89	0.17	0.4	100	0.10
SC#133	SXYL_00447	Glucuronate isomerase	S	0.4	100	0.06			
SC#1347	SXYL_01185	Putative uncharacterized protein	S	3.0	88	0.15			
SC#1407	SXYL_01251	Allophanate hydrolase subunit 1	S	1.9	60	0.05	0.5	80	0.02
SC#1411	SXYL_01255	UPF0271 protein	S	2.2	90	0.13	0.5	30	0.03
SC#1412	SXYL_01256	Putative divalent metal ion transporter	S	0.7	75	0.03			
SC#1420	SXYL_01265	Ribosomal silencing factor RsfS	S	1.6	100				
SC#1422	SXYL_01267	Putative uncharacterized protein	S	0.6	90	0.04			
SC#1453	SXYL_01297	Putative GTP cyclohydrolase 1 type 2	S	1.4	25		1.5	100	0.08
SC#1465	SXYL_01309	Putative uncharacterized protein	S	0.6	83	0.02			
SC#1536	SXYL_01387	Putative uncharacterized protein	S	0.6	71	0.01			
SC#1537	SXYL_01388	Putative membrane protein	S	1.6	100	0.10			
SC#1547	SXYL_01398	Putative uncharacterized protein	S	0.6	100	0.04			
SC#1553	SXYL_01405	Putative N6-adenine-specific DNA methylase	S	1.9	100	0.08	1.6	50	
SC#1618	SXYL_01471	Putative uncharacterized protein	S	1.9	80	0.05			
SC#162	SXYL_00475	Uncharacterized protein	S	1.5	100	0.11	0.4	67	0.03
SC#1654	SXYL_01506	Putative membrane protein	S	0.7	60	0.05	0.6	80	0.07
SC#1673	SXYL_01523	Putative uncharacterized protein	S				2.8	100	
SC#1675	SXYL_01525	Putative permease	S				2.4	67	0.24
SC#1691	SXYL_01543	UPF0291 protein	S	0.6	75	0.01	0.5	100	0.03
SC#1692	SXYL_01544	Putative uncharacterized protein	S	0.7	88	0.06			
SC#1735	SXYL_01585	Uncharacterized protein	S	0.6	75	0.07			
SC#1737	SXYL_01587	Putative uncharacterized protein	S	0.4	100	0.10			
SC#1740	SXYL_01590	Uncharacterized protein	S	0.5	67	0.01			
SC#1741	SXYL_01591	Phage-related protein	S	1.3	100	0.04			
SC#1763	SXYL_01614	Uncharacterized protein	S	0.7	80	0.02			
SC#1766	SXYL_01617	Uncharacterized protein	S	0.7	100	0.04			
SC#1818	SXYL_01675	Putative uncharacterized protein	S	0.6	100	0.03	0.3	90	0.02
SC#1825	SXYL_01682	Putative membrane protein	S	0.6	80	0.03			
SC#1857	SXYL_01719	Putative uncharacterized protein	S	0.6	80	0.03			
SC#186	SXYL_02541	Membrane protein	S	2.1	100	0.31	0.5	83	0.02
SC#1866	SXYL_01725	Putative uncharacterized protein	S	1.8	71	0.07			
SC#1867	SXYL_01726	Uncharacterized protein	S	2.1	100	0.04			
SC#1939	SXYL_01818	Putative membrane protein	S	0.6	80	0.04	0.6	80	0.07
SC#1950	SXYL_01829	UPF0637 protein	S	1.9	100	0.09	1.7	83	0.07
SC#1951	SXYL_01830	Putative membrane protein	S	1.8	78	0.17			
SC#1972	SXYL_01851	Glutaredoxin	S	2.0	75	0.41			
SC#2004	SXYL_01883	Putative uncharacterized protein	S	0.3	100		0.7	100	
SC#2017	SXYL_01898	Uncharacterized protein	S	2.0	100				
SC#2041	SXYL_01928	Adenylate cyclase family protein	S	1.6	100	0.10			
SC#2043	SXYL_01930	UPF0413 protein	S	0.6	50		0.5	100	0.00
SC#2062	SXYL_01948	Putative uncharacterized protein	S	1.7	80	0.12	1.5	20	0.01
SC#2105	SXYL_01991	Putative uncharacterized protein	S	0.6	67	0.05			
SC#2145	SXYL_02039	Putative uncharacterized protein	S	1.8	100	0.10			
SC#2180	SXYL_02072	Putative uncharacterized protein	S	1.7	100		1.5	100	
SC#2183	SXYL_02075	Putative uncharacterized protein	S	0.5	90	0.03			
SC#2184	SXYL_02076	Epimerase family protein	S	0.7	100	0.05			
SC#221	SXYL_02444	Putative methyltransferase	S	0.7	100	0.03			
SC#2219	SXYL_02112	Uncharacterized protein	S	0.7	100	0.05			
SC#227	SXYL_02452	Nucleoid-associated protein	S	0.7	100	0.03			
SC#2302	SXYL_02193	Uncharacterized protein	S	1.7	86	0.06			
SC#2338	SXYL_02228	Uncharacterized protein	S	0.4	100	0.04			
SC#2339	SXYL_02229	Uncharacterized protein	S	1.9	90	0.25	1.8	70	0.10
SC#2357	SXYL_02247	NAD(P)H-dependent oxidoreductase	S	0.8	100				
SC#2392	SXYL_02282	Uncharacterized protein	S				0.6	67	0.06
SC#2405	SXYL_02295	GTP cyclohydrolase FolE2	S				0.5	90	0.03
SC#2422	SXYL_02312	FMN-dependent oxidoreductase, nitritriacetate monooxygenase family	S	1.9	75	0.08	0.5	100	
SC#2429	SXYL_02319	Putative uncharacterized protein	S	0.5	67	0.08			
SC#2439	SXYL_02330	Uncharacterized protein	S	1.2	33		1.4	67	0.05
SC#2449	SXYL_02340	C4-dicarboxylate transport system permease large protein	S				0.3	67	0.04
SC#2459	SXYL_02350	Putative uncharacterized protein	S						
SC#248	SXYL_02475	Uncharacterized protein	S						
SC#2488	SXYL_02379	Methyltransferase small domain protein	S						
SC#251	SXYL_02478	Uncharacterized protein	S						
SC#2536	SXYL_00756	Putative uncharacterized protein	S						

SC#2569	SXYL_02034	Uncharacterized protein	S	1.5	100	0.05			
SC#2573	SXYL_01896	Uncharacterized protein	S	1.6	100	0.01			
SC#2600	SXYL_00412	Putative uncharacterized protein	S	1.4	100	0.07			
SC#2613	SXYL_00521	Putative lipid-binding protein YceI-like	S	1.6	86	0.12			
SC#2643	SXYL_00551	Putative uncharacterized protein	S				0.4	75	0.02
SC#2644	SXYL_00552	Putative uncharacterized protein	S	2.1	75	0.39			
SC#2674	SXYL_00854	Putative membrane protein	S	0.7	80	0.03	1.3	80	0.04
SC#2678	SXYL_00876	Uncharacterized protein	S	0.7	80	0.01	1.3	40	0.08
SC#2698	SXYL_01085	Putative uncharacterized protein	S	0.4	78	0.06	0.4	78	0.08
SC#2712	SXYL_01214	Putative uncharacterized protein	S	0.6	75	0.00			
SC#2717	SXYL_01264	HAD family hydrolase	S	0.7	71	0.02			
SC#2719	SXYL_01283	UPF0365 protein	S	0.6	90	0.02	0.6	80	0.04
SC#2721	SXYL_01296	Putative tRNA methyltransferase	S	0.6	86	0.07			
SC#2730	SXYL_01455	Xylose isomerase domain-containing protein	S				0.4	75	0.09
SC#2731	SXYL_01465	Uncharacterized protein	S	0.7	80	0.02	1.5	30	0.04
SC#274	SXYL_02506	Uncharacterized protein	S	0.3	100	0.15	0.5	100	0.09
SC#2775	SXYL_01772	Putative uncharacterized protein	S	0.5	100	0.08			
SC#2780	SXYL_01808	Putative uncharacterized protein	S	0.6	67	0.01			
SC#2814	SXYL_02342	C4-dicarboxylate transport system substrate-binding protein	S				0.5	100	0.02
SC#2830	SXYL_02524	Uncharacterized protein	S				1.5	89	0.07
SC#2832	SXYL_02566	Non-ribosomal peptide synthetase	S	0.5	80	0.04	1.9	70	0.14
SC#300	SXYL_02539	Uncharacterized protein	S	0.6	67	0.01			
SC#309	SXYL_02550	Uncharacterized protein	S	1.5	80	0.20			
SC#364	SXYL_02647	Uncharacterized protein	S				2.8	100	0.43
SC#502	SXYL_00029	Possible abortive infection phage resistance protein	S	0.6	75	0.10	1.4	13	
SC#503	SXYL_00030	Putative uncharacterized protein	S	0.7	100	0.11			
SC#553	SXYL_00092	Uncharacterized protein	S	1.8	80	0.11	1.4	80	0.06
SC#558	SXYL_00098	Uncharacterized protein	S				0.5	100	0.09
SC#564	SXYL_00105	Ethanolamine utilization protein EutH	S				3.0	70	0.18
SC#598	SXYL_00193	Uncharacterized protein	S				1.7	67	0.09
SC#606	SXYL_00240	Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	S	0.5	70	0.05			
SC#633	SXYL_00289	Uncharacterized protein	S	1.3	100				
SC#686	SXYL_00177	Uncharacterized protein	S				1.6	67	0.03
SC#699	SXYL_00192	Uncharacterized protein	S	1.4	56	0.02	1.6	78	0.11
SC#703	SXYL_00197	Uncharacterized protein	S	0.6	75	0.04			
SC#707	SXYL_00202	Uncharacterized protein	S				0.6	70	0.02
SC#711	SXYL_00208	Putative pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein	S				0.1	75	0.01
SC#712	SXYL_00209	Glyoxalase family protein	S				0.2	100	0.11
SC#75	SXYL_00389	Uncharacterized protein	S	1.6	88	0.33	1.5	75	0.03
SC#759	SXYL_00281	Membrane protein	S	1.5	100	0.21			
SC#778	SXYL_00485	Uncharacterized protein	S	0.1	89	0.12	2.2	44	0.22
SC#780	SXYL_00487	Uncharacterized protein	S	0.1	100	0.03	2.2	60	0.04
SC#794	SXYL_00501	Membrane protein	S	1.6	80	0.03			
SC#802	SXYL_00509	Uncharacterized protein	S	2.1	100	0.27			
SC#824	SXYL_00575	Uncharacterized lipoprotein	S				0.5	70	0.04
SC#852	SXYL_00602	Membrane protein	S	0.6	88	0.06			
SC#853	SXYL_00603	Uncharacterized protein	S	0.5	80	0.07			
SC#856	SXYL_00606	Uncharacterized protein	S	0.4	88	0.07	0.5	75	0.08
SC#881	SXYL_00630	Membrane protein	S	1.3	67	0.02			
SC#883	SXYL_00632	Membrane protein	S	0.7	75	0.02	0.7	25	
SC#1811	SXYL_01668	Putative serine/threonine protein kinase	T	0.5	67	0.04	0.8	11	
SC#1660	SXYL_01511	Peptidase, M42 family	U				1.7	80	0.13
SC#974	SXYL_00725	Preprotein translocase subunit secY	U	0.6	80	0.04			

**UTILISATION DE DIFFERENTES SOURCES DE
FER CHEZ LA SOUCHE *STAPHYLOCOCCUS*
XYLOSUS C2A : ETUDE DU MECANISME
D'ACQUISITION DU FER A PARTIR DE LA
FERRITINE**

Contexte de l'étude

Pour contourner la difficulté d'acquérir du fer dans les différentes niches écologiques, les staphylocoques ont développé plusieurs mécanismes. Ces mécanismes ont été particulièrement étudiés chez les bactéries pathogènes et notamment chez *S. aureus*. L'acquisition de fer, et en particulier de l'hème présent chez l'hôte, est requise pour la colonisation et donc la pathogénèse de *S. aureus*. Si plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes d'acquisition du fer via l'hémoglobine et la transferrine chez les staphylocoques, aucune donnée n'existe chez ce genre bactérien concernant le mécanisme d'acquisition du fer contenu dans la ferritine. Or il s'agit d'une source de fer importante dans la viande. La ferritine est une protéine capable de fixer jusqu'à 4 500 atomes de fer, ce qui en fait une source potentielle de fer très intéressante pour les bactéries. Cependant le fer contenu dans la ferritine est stocké sous forme de cristaux de ferrihydrites à l'intérieur d'une cage protéique, cette source n'est donc pas aisément accessible.

Notre premier objectif a été d'étudier les sources de fer pouvant être utilisées *in vitro* par *S. xylosus*. Nous nous sommes ensuite focalisés sur la ferritine qui est une des sources préférentielles de fer chez *S. xylosus* et nous avons cherché à comprendre quel mécanisme était mis en place pour acquérir cette source. Pour répondre à cette deuxième question, nous avons dans un premier temps choisi une approche globale par puce à ADN pour étudier l'expression des gènes de *S. xylosus* en présence de ferritine en prenant comme référence le FeSO_4 . Nous avons par la suite ciblé par RT-qPCR quelques gènes d'intérêt pour mieux caractériser ce mécanisme puis nous avons réalisé une délétion dans le premier gène d'un opéron potentiellement impliqué dans l'acquisition du fer de la ferritine.

Résultats préliminaires

Croissance en présence de différentes sources de fer

Nous nous sommes intéressés aux quatre principales sources de fer présentes dans la viande : la ferritine, la transferrine, l'hémoglobine et la myoglobine.

La croissance de *S. xylosus* en milieu dépourvu de fer (Mx0) supplémenté ou non avec chacune de ces sources de fer a été suivie en microplaques en utilisant un Bioscreen (Labsystems). *S. xylosus* est capable de se multiplier et donc d'acquérir du fer à partir de la ferritine, de la transferrine, de l'hémoglobine et du FeSO_4 (Figure 32). La croissance de *S.*

xylosus est maximale avec 5 μM de ferritine, 80 μM de transferrine, 20 μM d'hémoglobine et 50 μM de FeSO_4 . On note une inhibition de la croissance bactérienne avec 40 μM d'hémoglobine (Figure 32). Concernant la myoglobine, une faible croissance est observée après une phase de latence prolongée. De plus, la croissance de *S. xylosus* est identique quelque soit les concentrations de myoglobine testées (5, 20 et 40 μM) (Figure 32).

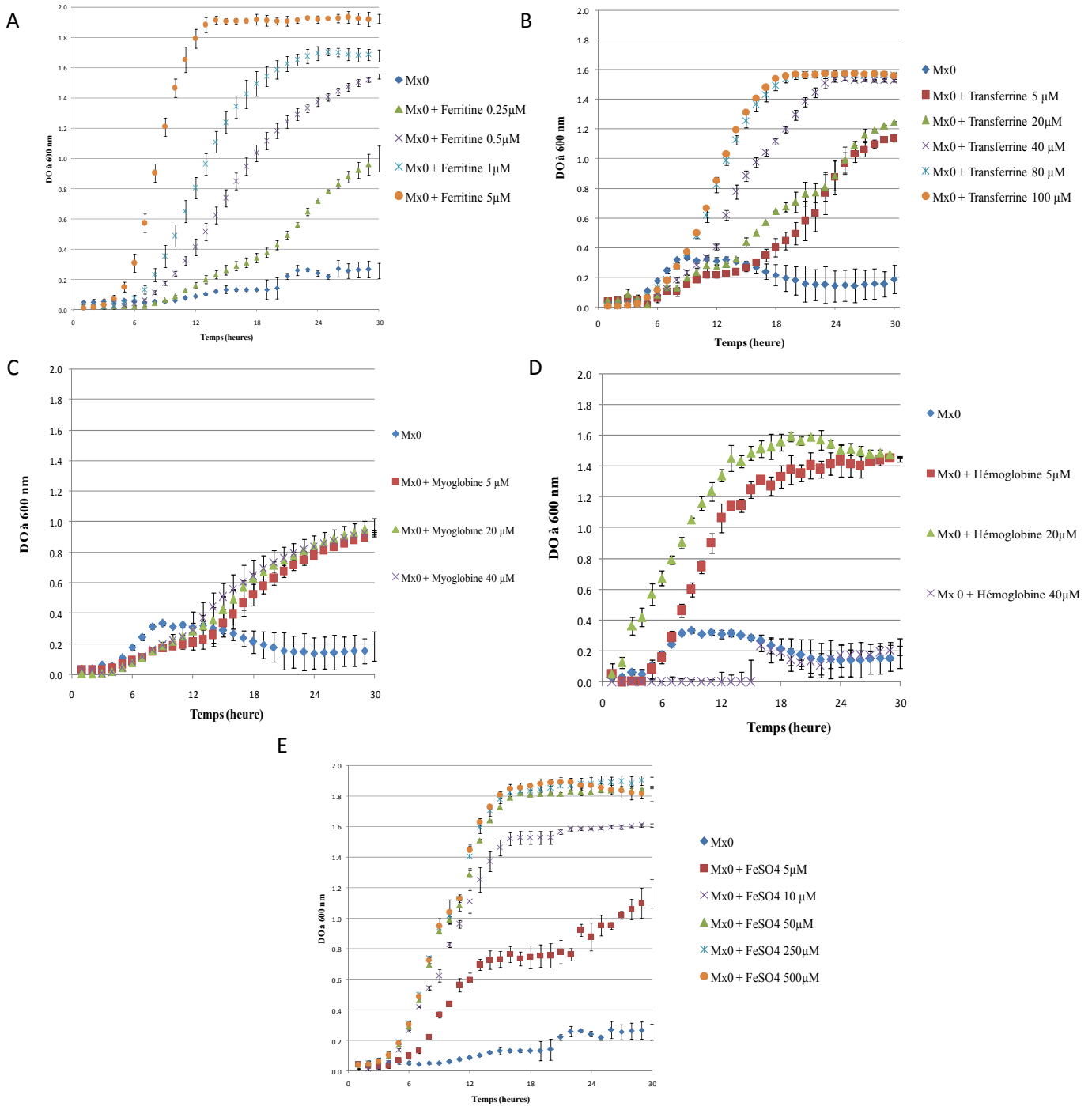


Figure 32: Croissance de *S. xylosus* en présence (A) de ferritine, (B) de transferrine, (C) de myoglobine, (D) d'hémoglobine et (E) de FeSO_4

La vitesse maximale de croissance ou μ_{\max} (h^{-1}) de *S. xylosus* varie en fonction des sources de fer. Elle est maximale à 5 μM de ferritine et atteint 0.38 h^{-1} . La vitesse maximale de croissance est similaire à 80 μM de transferrine, 20 μM d'hémoglobine et 50 μM de FeSO_4 et atteint 0.23 h^{-1} . La valeur la plus basse est observée pour la myoglobine avec une vitesse maximale de croissance de 0.13 h^{-1} (Tableau 5).

Tableau 5: Vitesse maximale de croissance de *S. xylosus* en présence de ferritine, FeSO_4 , transferrine, myoglobine ou hémoglobine

	μ_{\max} (h^{-1})
Ferritine (5 μM)	0.38
Transferrine (80 μM)	0.23
Hémoglobine (20 μM)	0.23
FeSO_4 (50 μM)	0.23
Myoglobine (40 μM)	0.13

Mise en évidence de la production de sidérophore en milieu carencé en fer

L'analyse *in silico* du génome nous a révélé que *S. xylosus* C2a possède plusieurs systèmes d'acquisition et de transport du fer. Parmi ces systèmes, le cluster de gènes *sfa*, pourrait être impliqué dans la production de sidérophores de type carboxylate. Nous avons voulu vérifier si cette souche produisait des sidérophores.

La souche C2a a été incubée en milieu de culture carencé en fer (Mx0) et en milieu SSD (Siderophore Staphylococcal Detection). Les surnageants de culture ont été prélevés à 24h de croissance. Un test chrome azurol S (CAS) a été réalisé en milieu liquide (Figure 33). Ce test est positif dans les deux milieux pour la souche C2a. Elle est donc capable de produire au moins un sidérophore.

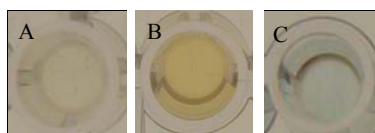


Figure 33: Test CAS sur le surnageant de culture de *S. xylosus* C2a en Mx0 (A) surnageant de culture, (B) témoin positif : pyoverdine et (C) témoin négatif : Mx0 nonensemencé

Si l'on compare la production de sidérophores par un test O-CAS entre *S. aureus* MW2 et *S. xylosus* C2a en milieu Mx0 agar, on remarque que cette production est nettement plus faible chez la souche C2a que chez *S. aureus* MW2 (Figure 34).



Figure 34: Test O-CAS en milieu Mx0 agar avec (A) *S. aureus* MW2 et (B) *S. xylosus* C2a

Résultats principaux de l'étude

➤ La souche *S. xylosus* C2a est capable d'acquérir du fer provenant de la ferritine comme seule source de fer. Seules quelques bactéries sont capables de faire cette acquisition. Des mécanismes protéolytiques ou d'acidification locale ont été mis en évidence chez ces bactéries visant à déstabiliser la coque protéique de la ferritine. Nous avons montré en utilisant un cocktail d'inhibiteurs de protéases que la croissance de *S. xylosus* C2a n'était pas impactée. Nous avons également montré via un test en boîte de Pétri au vert de Bromocresol qu'il n'y avait pas d'acidification locale en surface de *S. xylosus*.

➤ Afin de trouver des gènes potentiellement impliqués dans l'acquisition du fer de la ferritine, nous avons dans un premier temps évalué l'expression des gènes de *S. xylosus* via l'utilisation de la puce à ADN en prenant la condition Mx0/FeSO₄ comme référence. Nous avons ainsi comparé les conditions Mx0/ferritine 5 µM et Mx0/FeSO₄ 50 µM. L'analyse statistique de ces résultats nous a révélé que les gènes *sfaA*, *htsB* et *fhuC* (via son rôle d'ATPase) impliqués dans la production et la reconnaissance de la staphyloferrine A ainsi que les gènes *sstA* et *sstD* impliqués dans la reconnaissance d'un large spectre de substrats comme la transferrine, ne sont pas différentiellement exprimés. Par ailleurs, les gènes *sitABC* impliqués dans le transport de cations divalents comme le fer étaient fortement sous exprimés en présence de ferritine. De façon très intéressante, nous avons trouvé des gènes codant potentiellement deux oxydo-réductases (SXYL_00561, SXYL_00562) et une perméase (SXYL_00563) fortement surexprimés en présence de ferritine. Nous avons ciblé dans un deuxième temps ces 10 gènes d'intérêt par RT-qPCR. Nous avons confirmé nos résultats et en particulier que les gènes SXYL_00561, SXYL_00562 et SXYL_00563 étaient fortement surexprimés plus de 20 fois.

➤ Les gènes SXYL_00561, SXYL_00562 et SXYL_00563 forment un opéron de trois gènes. Ces gènes pourraient coder un complexe enzymatique membranaire composé de deux oxydo-réductases et d'une perméase. Afin de mieux comprendre le rôle de ce système dans l'acquisition du fer de la ferritine, nous avons réalisé une délétion et insertion d'une cassette de résistance dans le gène SXYL_00561 codant une oxydo-réductase potentielle (Annexe 3). Ce gène est le premier gène de cet opéron. Nous observons un temps de latence plus long et une vitesse maximale de croissance plus faible chez le mutant C2a Δ 561 comparé à la souche sauvage en présence de 0.5 ou 5 μ M de ferritine. En revanche, nous n'observons pas de différence de croissance en présence de FeSO_4 50 ou 500 μ M entre les souches *S. xylosus* C2a sauvage et C2a Δ 561.

➤ Afin de caractériser l'effet de la mutation Δ 561, nous avons comparé, en présence de ferritine, l'expression de 10 gènes qui répondent au stress oxydant chez la souche C2a Δ 561 par rapport à la souche sauvage. Parmi ces gènes, *katB*, *katC* et *bsaA* qui codent respectivement deux catalases et une glutathion peroxydase sont sous exprimés. Ces enzymes interviennent dans la détoxification de l' H_2O_2 et sont souvent surexprimés en présence de fer car ils contribuent à l'oxydation via la réaction de Fenton.

➤ A noter à ce stade de l'étude, la complémentation de la souche C2a Δ 561 reste à faire.

Résultats complémentaires de l'étude

Dosage du fer intracellulaire et extracellulaire

Pour connaître les quantités de fer internalisées par *S. xylosus* en présence de FeSO_4 ou de ferritine, nous avons réalisé un dosage de fer par une méthode colorimétrique en utilisant de la ferrozine (Riemer *et al.*, 2004).

Les bactéries ont été incubées en présence de FeSO_4 ou de ferritine à différentes concentrations et centrifugées en milieu de phase exponentielle. Les bactéries ont été cassées par un traitement physique avec des billes de verre. La quantification du fer est réalisée selon la méthode de Riemer *et al.*, (2004) avec l'action d'un réactif contenant du HCl et du KMNO_4 permettant de relarguer du fer. Le contenu intracellulaire de fer a été rapporté à la quantité de protéines contenues dans les cellules lysées mesurée selon la méthode de Bradford.

La limite de détection de ce test a été établie à 1 μM de fer. On note que de faibles quantités de fer sont incorporées dans la cellule puisque les quantités de fer retrouvées dans les surnageants de culture sont proches de celles retrouvées dans les milieux non ensemencés. On remarque que la quantité de fer intracellulaire augmente de 5 à 50 μM de FeSO_4 , cette quantité ne varie pas si l'on ajoute une plus haute concentration de FeSO_4 (Tableau 6). Aucune variation de la quantité de fer intracellulaire n'a été observée entre 0.5 et 5 μM de ferritine (Tableau 6). La quantité de fer intracellulaire mesurée en présence de ferritine 0.5 μM apparaît 30 fois supérieure à celle mesurée en présence de 50 ou 250 μM de FeSO_4 . Ce résultat ne nous semble pas pertinent puisque dans le milieu Mx0/ferritine 0.5 μM de l'ordre de 200 μM de fer est disponible (Tableau 6).

Tableau 6: Bilan des dosages de fer

		Moyenne	Ecart type
Mx0 + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	< 1	x
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	< 1	x
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.018	0.002
Mx0 + FeSO_4 1 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	1.3	0.1
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	1.4	0.3
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.017	0.001
Mx0 + FeSO_4 5 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	5.9	1.1
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	5.6	0.4
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.017	0.001
Mx0 + FeSO_4 25 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	25.1	0.2
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	24.2	2.5
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.025	0.002
Mx0 + FeSO_4 50 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	47.4	0.5
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	46.5	0.5
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.036	0.005
Mx0 + FeSO_4 250 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	234.2	1.1
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	226.6	1.5
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.032	0.002
Mx0 + ferritine 0.5 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	205.0	11.3
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	155.2	3.4
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	1.211	0.184
Mx0 + ferritine 5 μM + C2a	Milieu non ensemencé ($\mu\text{mol Fe/L}$)	2092.0	81.0
	Surnageant de culture ($\mu\text{mol Fe/L}$)	1889.8	49.3
	Contenu intracellulaire ($\mu\text{mol Fe/mg protéine}$)	0.995	0.125

Visualisation de la ferritine en surface de *S. xylosus*

Nous avons regardé si la ferritine pouvait interagir avec la surface de *S. xylosus* par une technique de microscopie électronique à transmission (MET) selon deux approches.

Les bactéries incubées avec de la ferritine ont été traitées avec des anticorps anti-ferritine. Ces anticorps ont été détectés par la protéine A conjuguée avec des particules d'or de 10 nm.

Après lavage, les échantillons ont été métallisés avec de l'acétate d'uranyle et observés (Figure 35 A et B).

En parallèle, les bactéries ont été incubées avec de la ferritine et directement incluses dans une résine, cette résine a été coupée avec un ultra microtome et les coupes ont été visualisée après coloration négative à l'acétate d'uranyle en MET (Figure 35 C).

Ces deux techniques ne nous ont pas permis de localiser la ferritine à la surface de la bactérie. Elle a cependant été détectée dans l'environnement cellulaire de *S. xylosus*. La ferritine est piégée dans l'exopolymère produit par *S. xylosus*. Cette observation pourrait expliquer les valeurs anormalement élevées que nous avons obtenues lors de la mesure du fer intracellulaire. En effet il est impossible de séparer le polymère des cellules et donc la ferritine piégée est relarguée dans le contenu intracellulaire lors de la lyse.

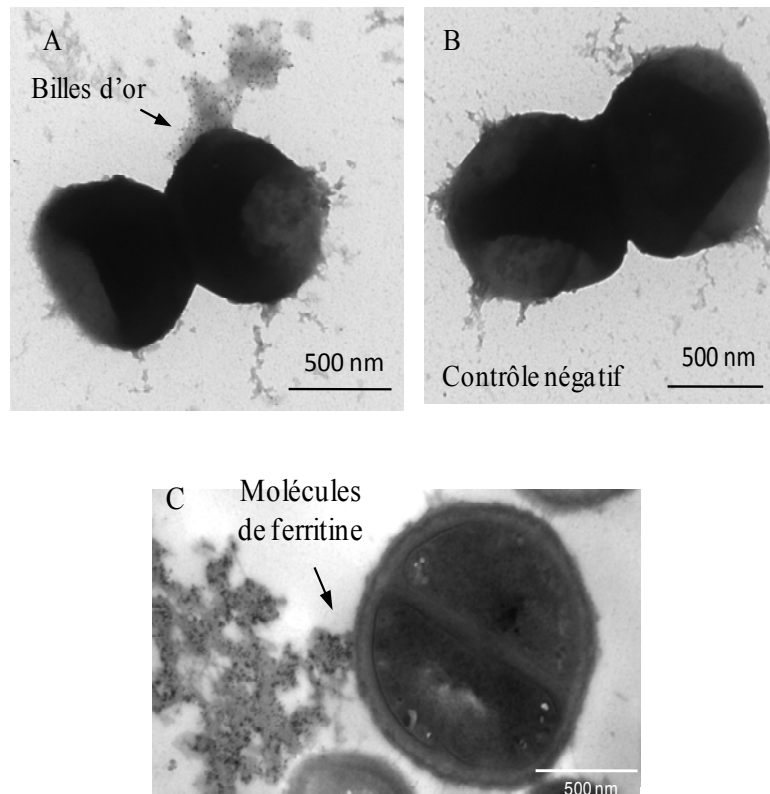


Figure 35: Visualisation de la ferritine dans l'environnement cellulaire de *S. xylosus* par microscopie électronique à transmission (A) et (B) marquage immunologique, (C) après inclusion directe dans la résine

Article 3

Version préliminaire
Non soumise

Ferritin, an iron meat source for *Staphylococcus xylosus*?

VERMASSEN Aurore, TALON Régine, LEROY Sabine

INRA, UR454 Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

INTRODUCTION

Staphylococcus xylosus belongs to the vast group of coagulase-negative staphylococci (CNS). It is a ubiquitous species, which is found in various environments (Kloos *et al.*, 1976; Nagase *et al.*, 2002). In particular, *S. xylosus* lives naturally on the skin and mucous membranes of mammals. So it occurs in foods of animal origin, such as meat, milk, fermented meat products and cheese (Coton *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2010). It is also widespread used as starter culture for meat fermentation (Talon & Leroy, 2011). *S. xylosus* has the ability to grow on meat, to survive during the process of meat fermentation and to remain viable for long periods of time in fermented meat products, such as dry sausages (Blaiotta *et al.*, 2004; Corbiere Morot-Bizot *et al.*, 2006). The capability of *S. xylosus* to use meat substrates contributes to its adaptation to this environment. Meat is an iron-rich substrate but this element lacks of bioavailability, being complexed within the heme as a cofactor for myoglobin or hemoglobin, or bound within ferritin or transferrin (Linder *et al.*, 1981). What source of iron *S. xylosus* can use in meat remains unknown.

For almost all bacteria, iron is a key element, required for survival and for many cellular processes (Wandersman & Delepelaire, 2004). Staphylococci have evolved a plethora of mechanisms to acquire iron from the host, including the elaboration of siderophores, the utilization of exogenous siderophores, the acquisition of iron from heme and hemoproteins, and the uptake of inorganic free iron (Beasley & Heinrichs, 2010; Haley & Skaar, 2012; Sheldon & Heinrichs, 2012). Among these mechanisms, two are present only in pathogenic staphylococci. The first is the iron-regulated surface determinant (Isd) system allowing the capture of heme from hemoglobin and its transfer into the cytoplasm and is present only in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus lugdunensis* (Skaar & Schneewind, 2004; Zapotoczna *et al.*, 2012). The second system is only present in *S. aureus* and is responsible for synthesis and transport of the staphyloferrin B (Dale *et al.*, 2004). Most studies on iron acquisition concern the pathogenic *S. aureus* species and focus on the acquisition of this essential element from hemoglobin or transferrin (Hammer & Skaar, 2011; Skaar *et al.*, 2004). To our knowledge, nothing is known about ferritin-iron acquisition for staphylococci.

Ferritin is a ubiquitous intracellular storage protein for iron. It is composed of 24 subunits that self-assemble through non-covalent interactions into a hollow spherical shell and contains up to 4,500 iron atoms, making it a potentially rich iron source for bacteria. Ferritin protein cages synthesize internal nanominerals from Fe(II) and O₂ or H₂O₂ with a ferrihydrite structure (Bou-Abdallah, 2010). Ferritin is a remarkable iron source but to acquire it, bacteria must be able to remove it from this stable supramolecular complex.

There are only few published reports describing microorganisms able to acquire iron from ferritin and even less characterizing the mechanisms implicated in this acquisition. Ferritin-iron acquisition has been demonstrated in *Listeria monocytogenes* involving a surface-associated ferric reductase (Deneer *et al.*, 1995) and in *Burkholderia cenocepacia*, which uses a mechanism requiring proteolytic ferritin degradation by a serine protease (Whitby *et al.*, 2006). *Bacillus cereus* can acquire iron from various host proteins and among them from ferritin. In this species, the surface protein Ilsa is absolutely required for ferritin-iron acquisition (Daou *et al.*, 2009). Recently, it was shown that this protein acts as a ferritin receptor, which causes the aggregation of ferritin on the surface of *B. cereus* (Segond *et al.*, 2014). These authors have proposed a model of ferritin-iron acquisition in *B. cereus* in which the surface protein enhances iron release and then the iron-uptake is assisted by the siderophore bacillibactin (Segond *et al.*, 2014). The opportunistic pathogen yeast, *Candida albicans*, captures ferritin through the invasion-like adhesin Als3, which is associated with hyphal morphology and uses a reductive pathway for iron uptake (Almeida *et al.*, 2008). Moreover, *C. albicans* mediates an acidification of growth medium leading a dissociation of ferritin structure (Almeida *et al.*, 2008).

Ferritin sequesters the intracellular iron and is found in all tissues (Arosio *et al.*, 2009). So ferritin is also one of the major sources of iron in meat (Linder *et al.*, 1981). Our preliminary data indicated that *S. xylosus* may acquire iron from this source and in a microarray study of the *S. xylosus* strain C2a, we identified three genes significantly up regulated that could be involved in the acquisition of iron from ferritin. These genes encode two putative oxidoreductases and a membrane protein, respectively (our unpublished data).

In this study, we have characterized the growth of *S. xylosus* in presence of ferritin as a sole iron source. We have shown that these three genes are transcribed as an operon encoding a putative reductive uptake that is implicated in ferritin-iron acquisition.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

Staphylococcus xylosus and *Escherichia coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *S. xylosus* strains were serially precultured into polycarbonate erlen-meyer flasks 24 hours at 30°C and with orbital shaking of 150 rpm in Mx0 medium unless indicated otherwise. Mx0 consists of (per liter): 1 g Na₃-citrate 2H₂O, 7 g Na₂HPO₄ 2H₂O, 3 g KH₂PO₄, 1 g NaCl, 1 g KCl, 4 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g MgSO₄ 7H₂O, 0.0147 g CaCl₂ 2H₂O, 4.6 mg nicotinic acid, 2 mg thiamine hydrochloride, 0.012 mg biotin, 5 g glucose, and 6 g casamino acids. This medium does not contain iron and trace elements sources. Then iron-starved strains were subcultured at 30°C into medium supplemented or not with horse spleen ferritin (0.25, 0.5, 1 or 5 µM) or FeSO₄ (5, 50, 250 or 500 µM). When needed, agar (Difco) containing or not bromocresol green as a pH indicator was added. Fresh solution of ferritin was passed through Amicon ultra filters units 10 kDa (Millipore) to eliminate trace of released iron. *E. coli* was routinely grown under aerobic conditions in Luria-Bertani broth (Difco Laboratories) at 37°C. Cell growth was monitored by reading optical density at 600 nm. Antibiotics were added at the following concentrations when necessary: for *E. coli*, ampicillin 100 µg/ml; for *S. xylosus*, chloramphenicol 20 µg/ml, and erythromycin 2.5-10 µg/ml. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich.

Bioscreen assay

Precultures of *S. xylosus* strains in Mx0 were diluted in fresh Mx0 media supplemented or not with ferritine, FeSO₄ to an OD_{600 nm} of 0.04. Cells were grown at 30°C in 100-wells microtiter plate under continuous shaking in a Bioscreen C plate reader (Labsystems). Every 30 min, the OD_{600 nm} was measured. Three independent experiments were done for each condition.

When needed, a protease inhibitor cocktail (P8465) was added and prepared according to the manufacturer's instructions (Sigma). This mixture containing AEBSF, sodium EDTA, Bestatin, Pepstatin A and E64 has a broad specificity against serine, cysteine, and aspartic proteases, metalloproteases, and aminopeptidases. The concentrations tested were adjusted on the final EDTA concentration between 0.2 to 2 mM to avoid inhibition of bacterial growth.

Genomic DNA isolation

S. xylosus C2a gDNA was prepared from overnight cultures grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco) with agitation at 37°C. Briefly, cells were resuspended in Tris-EDTA-sucrose buffer containing lysostaphin 0.1 mg/mL and incubated 30 min at 37°C. Cells were lysed with sodium dodecyl sulfate and treated with RNase A. Following extraction with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25/24/1) and chloroform, gDNA was precipitated with ethanol and resuspended in Tris-HCl (10 mM; pH 8.5). DNA was quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

RNA extraction and purification

S. xylosus was grown to mid-log phase and 15 ml of culture were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen to stabilize the bacterial RNA. They were stored at -80°C. For RNA extraction, cell pellets were thawed on ice and resuspended in 500 µl of ice-cold Tris-EDTA buffer. The samples were transferred to tubes containing 600 mg of zirconia-silica beads (0.1 mm diameter), 50 µL of sodium dodecyl sulfate (10%), 3.5 µl of β-mercaptoethanol, and 500 µl of acid phenol. Cells were disrupted by two cycles of 60 s each at 6 m/s by using a FastPrep (MP Biomedicals). After the addition of 200 µl of chloroform and centrifugation, the aqueous phase was collected and was purified with the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. A supplementary treatment was performed with Turbo DNase (Ambion) to remove residual DNA contamination. The absence of genomic DNA contamination was verified by PCR targeting the *rpoB* gene. Total RNA isolated was quantified using a Nanodrop 1000. The RNA was stored at -80°C.

Reverse transcription and quantitative PCR

RNA isolated from three independent biological replicates for each condition or each strain was reverse transcribed to cDNA with SuperScript Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Quantitative PCR was performed using Real Plex Master Cycler (Eppendorf) with IQTM SYBR®Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Thermal cycling consisted of 30 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C. The primer sequences of targeted genes are listed in supplementary Table S1. All genes were quantified in duplicate for the three independent biological samples. The relative fold change of gene expression, using measured *rpoB* housekeeping gene expression, was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

Reverse transcription mapping

To determine if SXYL_00561, SXYL_00562, SXYL_00563 of the gene cluster are co-transcribed, we mapped the mRNA species transcribed from this cluster. cDNA was subjected to PCR using pairs of primers targeting specifically each gene and each border junction of two adjacent genes (Table S1). Successful amplification would indicate the co-transcription of the two genes. The conditions for the amplification with GO Taq DNA polymerase (Promega) were 5 minutes at 95°C, followed by 25 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C and finally 5 minutes at 72°C. Reactions with genomic DNA template were performed as a positive control. The PCR products were visualized in a 2% agarose gel.

Construction of *S. xylosus* C2aA561 mutant strain

To inactivate the SXYL_00561-00563 operon, we made a deletion corresponding to amino acids 13 to 317 of the coding sequence and an insertion of an erythromycin resistance gene in the first gene of the operon (SXYL_00561) using the temperature-sensitive vector pBT2 (Brückner, 1997). A fragment of 2,459-bp was amplified using the primers Up561F1-EcoRI and Dn561R2-BamHI (Table 2) and purified with the QIAquick PCR purification kit (Quiagen). A 694-bp upstream fragment and a 851-pb downstream fragment were separately amplified by using this fragment as template and the primer pairs Up561F1-EcoRI and Up561R1-EmF, and Dn561F2-EmR and Dn561R2-BamHI, respectively (Table 2). The *ermB* gene was amplified from the pEC4 vector (Brückner, 1997) using the primers EmF-Up561R and EmR-Dn561F (Table 2). The amplified fragment was 1,366 bp. All amplifications were performed using Phusion High fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). The three PCR products were gel-purified with extraction from agarose using QIAquick gel extraction kit (Quiagen). Then the two fragments flanking SXYL_00561 and the *ermB* gene were annealed by overlapping PCR using the outside primers. The amplicon was gel-purified as

described above and was restricted with the corresponding restriction enzymes and cloned into the temperature-sensitive shuttle vector pBT2. The resulting plasmid pSXΔ561 was passaged through the *E. coli* TOP10, followed by recovery and electroporation into *S. xylosus* C2a using the method described by Brückner (1997). Then C2a containing pSXΔ561 was selected for chloramphenicol resistance on BHI agar at 30°C. A single colony was isolated, grown overnight in BHI broth at 30°C with 10 µg erythromycin/ml and subjected to erythromycin selection (2.5 µg/ml) for 4 days with regular dilution and subculture passages at 40°C, a nonpermissive temperature for pBT2 replication. Bacteria were plated on BHI agar containing 2.5µg of erythromycin/ml and then replica streaked on chloramphenicol BHI plates to screen for chloramphenicol sensitive colonies. Double-crossover events corresponding to SXYL_00561 disruption and presence of *ermB* cassette was confirmed by PCR using primers Up561F3 and Dn561R3 (Table 2) and by DNA sequencing. The resulting strain was named C2aΔ561 (Table 1).

Nucleotide sequence accession number

The GenBank accession number of the sequences reported in this paper is LN554884.

RESULTS

S. xylosus can use ferritin as sole source of iron

We measured, using Bioscreen C plate reader, the ability of the strain *S. xylosus* C2a to grow on various concentrations of ferritin in Mx0 medium and we compared these growth curves with those obtained on various concentrations of FeSO₄ (Figure 1). *S. xylosus* growth was dependant of the concentrations of iron sources. Its growth was very weak in Mx0 medium showing that any potential exogenous iron sources were available in this medium. The addition of either 0.25 µM ferritin or 5µM FeSO₄ increased significantly the growth of *S. xylosus* but only after a prolonged lag phase. Maximal growth rate and maximal population were reached at the highest concentration of ferritin (5 µM). Similar growth kinetic was obtained with 50 µM FeSO₄. Higher levels of FeSO₄ did not improve the growth kinetics observed with 50 µM.

To further define the ability of *S. xylosus* C2a to utilize ferritin, we examined the possibility that the ferritin-iron acquisition required an acidification of medium or a proteolytic ferritin degradation to enhance the availability of iron. The pH of medium remained stable at around 7.1 during the growth in presence of 5 µM ferritin. Moreover, during the growth on Mx0 agar containing ferritin and bromocresol green, the strain C2a did not acidify the medium. The protease inhibitor cocktail, whatever the concentration tested, had no effect on the growth of the C2a strain in the Mx0 medium supplemented with 0.5 or 5 µM ferritin as sole iron source (data not shown).

Transcriptional profiling of S. xylosus identified genes implicated for iron-ferritin acquisition

In a DNA microarray of *S. xylosus* C2a, we found that the expression of three genes co-localized, SXYL_00561, 00562 and 00563, was significantly up regulated during the growth on ferritin as sole iron source (our unpublished data). To carry out reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis, the *S. xylosus* C2a strain was grown in the Mx0 medium in presence of ferritin 5 µM or FeSO₄ 50µM into flasks with orbital shaking. No difference of growth was observed in these two conditions (supplementary Figure S1). After 8 hours of culture, RNA was harvested from the cells in the exponential phase of growth for each condition and subjected to RT-qPCR to determine the expression of the three genes mentioned above and eight additional genes of interest. These results are summarized in Table 3. Results of the RT-qPCR confirmed that the three genes, SXYL_00561, SXYL_00562 and SXYL_00563, were highly overexpressed under ferritin-iron growth condition (Table 3). The

five genes, *sfaA*, *htsB*, *fhuC*, *sstA* and *sstD*, did not show significant difference in their expression. These genes have a functional annotation from *S. aureus* suggesting a role in the production or transport of siderophore (*sfaA*, *htsB*, *fhuC*) and in the catecholamine-mediated uptake of iron from transferrin (*sstA*, *sstD*) (Beasley & Heinrichs, 2010; Beasley *et al.*, 2011). The *sitA*, *sitB* and *sitC* expression decreased dramatically in the cells grown in presence of ferritin as sole iron source compared to the growth in ferrous sulphate. These genes encode a iron-regulated ABC transporter (Cockayne *et al.*, 1998).

Co-transcription of the gene cluster after growth on ferritin

We used RT-PCR to establish whether the adjacent genes SXYL_00561, 00562 and 00563 were co-transcribed. The primers used were designed to amplify the 3' end of the upstream gene, the intergenic sequence, and 5' end of the downstream gene. A PCR product with the expected size was obtained for each pair of genes (Figure 2). Therefore, under the growth on ferritin, these genes appeared to be co-transcribed and thus form an operon.

Inactivation of SXYL_00561-00563 operon modified *S. xylosus* growth on ferritin

To analyze the contribution of the SXYL_00561-00563 operon to the capacity of *S. xylosus* to grow on ferritin as sole iron source, we constructed the C2aΔ561 mutant strain. The deletion of the first gene of this operon and the correct integration of the *erm* cassette were confirmed by PCR and sequencing of the PCR product to control. After serial precultures on Mx0 to obtain iron-starved strains, the wild type strain C2a and the mutant strain C2aΔ561 were grown in Mx0 containing ferritin 0.5 or 5 μM as sole iron source (Figure 3). A significant difference of growth between both strains was observed at the two concentrations of ferritin tested. We observed an apparent extension of the lag period prior to the growth and a lower maximal growth rate for the C2aΔ561 compared to the wild type. When both strains were grown in Mx0 containing FeSO₄ 50 or 500 μM, no difference of growth was observed between the mutant and the wild type (Figure 3).

Transcriptional profiling of the *S. xylosus* C2aΔ561 compared to the wild type in the face of ferritin-iron

Balance between uptake and storage of iron is of critical importance for bacteria in aerobic condition, since iron in combination with oxygen mediates the generation of reactive oxygen species. Therefore iron homeostasis is intimately linked to mechanisms of defense against oxidative stress. We focused on the expression of 9 genes which respond to oxidative stress or are implicated in iron storage. The strain C2a and the mutant C2aΔ561 were grown in Mx0 medium in presence of 5 μM ferritin into flasks with orbital shaking. RNA was harvested from the cells in the middle of growth exponential phase for each strain and subjected to RT-qPCR to determine the expression of the targeted genes. Among them, 3 genes, *katB*, *katC*, and *bsaA*, were differentially down expressed in the strain C2aΔ561 with a ratio of relative expression lower than 0.5 (Table 4).

DISCUSSION

For bacteria, the ability to cope with environment where iron is sequestered is essential for their growth and survival. Ferritin is an ubiquitous remarkable iron storage protein but the acquisition of iron from ferritin has been demonstrated only for a limited number of bacteria (Deneer *et al.*, 1995; Segond *et al.*, 2014; Whitby *et al.*, 2006). The present study shows for the first time that *S. xylosus*, a bacterium commonly isolated from meat products, is able to grow in presence of ferritin as sole source of iron and that a putative reductive uptake system encoded by a three-cistron operon, could be implicated in ferritin-iron uptake.

We showed that *S. xylosus* strain C2a has a limited growth under conditions of low-iron concentration. The growth is restored by addition of ferritin in the medium at sole source of

iron. An optimal growth was observed when the medium was supplemented with 5µM of ferritin. To further define the ability of *S. xylosus* to acquire ferritin-iron, we examined the possibility that the ferritin protein shell could be degraded by an acidification or a proteolytic process leading to iron release as described for other microorganisms (Almeida *et al.*, 2008; Whitby *et al.*, 2006). Our data showed that *S. xylosus* did not cause a physical degradation by such processes and how it could alter the ferritin to promote the iron release from the nanocage remains to characterize.

We showed that the expression of the three genes SXYL_00561, 00562 and 00563 was highly up regulated during the growth of *S. xylosus* on ferritin as sole iron source compared to incubation with ferrous sulphate. In the same conditions, we observed a high down expression of genes *sitABC* revealing the potential role of these genes in the acquisition of ferrous iron. These genes were first described in *Staphylococcus epidermidis* and encode an iron-regulated ABC transporter potentially implicated in divalent metal uptake (Cockayne *et al.*, 1998). The homologues of these genes in *S. aureus* named *mntABC* encode a transporter involved in the uptake of manganese (Horsburgh *et al.*, 2002). As recently reported in the review of Sheldon and Heinrichs (2012), the role of this ABC transporter in the iron acquisition is not completely elucidated. In *S. xylosus*, we showed that the genes *sitABC* were regulated by the presence of ferrous iron but not by ferritin-iron. No differential expression of the genes potentially involved in the production or transport of siderophores was observed under the two different growth conditions. So these genes were not regulated by the presence of ferritin iron.

The three genes SXYL_00561, 00562 and 00563 form an operon and are predicted to encode two monooxygenases and a putative transporter, respectively. BLAST analyses demonstrated that these genes are similar to genes present in *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus equorum* and show the same organization in cluster. They cannot be identified in the *S. aureus* genomes. These genes were not further characterized in other bacteria.

Our phenotype study revealed that the deletion-insertion in the first gene of the three-cistron operon caused a growth deficiency for the cells grown with ferritin as sole iron source. Moreover, the inactivation of this operon led to a down regulation of the genes *katB*, *katC* and *bsaA*, which encode catalases and glutathione peroxidase, respectively. These enzymes catalyze the reduction of H₂O₂ in H₂O and are implicated in the response to oxidative stress (Gaupp *et al.*, 2012). One hypothesis of the down regulation of these genes in the *S. xylosus* C2aΔ561 during growth under ferritin-iron conditions, could be that the cell iron content was lower in the mutant strain than in the wild type, which could lead to a reduce oxidative stress. Indeed, several genetic studies correlate oxidative stress with an increase of intracellular free iron (Touati, 2000).

Our data showed that *S. xylosus* implicated a specific uptake system to acquire iron from ferritin. The capacity of this species, commonly use as meat starter culture, to acquire ferritin-iron could be an advantage to grow and survive in this environment rich in ferritin. Further studies are required to determine whether the ferritin contributes to the meat adaptation of *S. xylosus* but also to the adaptation of *S. saprophyticus* and *S. equorum*, two other species frequently isolated from meat products.

ACKNOWLEDGEMENTS

Aurore Vermassen is a PhD Research Fellow funded by the French ‘Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (M.E.N.E.S.R.)’. We would like to thank Jean-Paul Chacornac and Carine Andant for valuable technical assistance.

REFERENCES

- Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Jr., Filler, S. G. & Hube, B. (2008). The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. *PLOS Pathogens* **4**, e1000217.
- Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. (2009). Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta* **7**, 589-599.
- Beasley, F. C. & Heinrichs, D. E. (2010). Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**, 282-288.
- Beasley, F. C., Marolda, C. L., Cheung, J., Buac, S. & Heinrichs, D. E. (2011). *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infection and Immunity* **79**, 2345-2355.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. & Parente, E. (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 271-284.
- Bou-Abdallah, F. (2010). The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta* **8**, 719-731.
- Brückner, R. (1997). Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiology Letters* **151**, 1-8.
- Cockayne, A., Hill, P. J., Powell, N. B., Bishop, K., Sims, C. & Williams, P. (1998). Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermidis* ABC transporter. *Infection and Immunity* **66**, 3767-3774.
- Corbiere Morot-Bizot, S., Leroy, S. & Talon, R. (2006). Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* **108**, 210-217.
- Coton, E., Desmonts, M.-H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christeans, S., Donnio, P.-Y., Lebert, I. & Talon, R. (2010). Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* **137**, 221-229.
- Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. & Heinrichs, D. E. (2004). Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infection and Immunity* **72**, 29-37.
- Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierne, H., Kallassy, M., Lereclus, D. & Nielsen-LeRoux, C. (2009). IIsA, A Unique Surface Protein of *Bacillus cereus* Required for Iron Acquisition from Heme, Hemoglobin and Ferritin. *PLOS Pathogens* **5**, e1000675.
- Deneer, H. G., Healey, V. & Boychuk, I. (1995). Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of *Listeria spp.* *Microbiology* **141**, 1985-1992.
- Gaupp, R., Ledala, N. & Somerville, G. A. (2012). Staphylococcal response to oxidative stress. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**.
- Haley, K. P. & Skaar, E. P. (2012). A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes and Infection* **14**, 217-227.

- Hammer, N. D. & Skaar, E. P. (2011).** Molecular Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Iron Acquisition. In *Annual Review of Microbiology*, Vol 65, pp. 129-147. Edited by S. Gottesman & C. S. Harwood. Palo Alto: Annual Reviews.
- Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Cox, A. G., Ingham, E., Peacock, S. & Foster, S. J. (2002).** MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Molecular Microbiology* **44**, 1269-1286.
- Kloos, W. E., Zimmerman, R. J. & Smith, R. F. (1976).** Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol* **31**, 53-59.
- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., Lebert, I. & Talon, R. (2010).** Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology* **27**, 294-301.
- Linder, M. C., Nagel, G. M., Roboz, M. & Hungerford, D. M., Jr. (1981).** The size and shape of heart and muscle ferritins analyzed by sedimentation, gel filtration, and electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 9104-9110.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002).** Isolation and species distribution of *staphylococci* from animal and human skin. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* **64**, 245-250.
- Segond, D., Abi Khalil, E., Buisson, C., Daou, N., Kallassy, M., Lereclus, D., Arosio, P., Bou-Abdallah, F. & Nielsen Le Roux, C. (2014).** Iron acquisition in *Bacillus cereus*: the roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. *PLoS Pathogens* **10**, e1003935.
- Sheldon, J. & Heinrichs, D. (2012).** The iron-regulated staphylococcal lipoproteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**.
- Skaar, E. P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K. L. & Schneewind, O. (2004).** Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* **305**, 1626-1628.
- Skaar, E. P. & Schneewind, O. (2004).** Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes and Infection* **6**, 390-397.
- Talon, R. & Leroy, S. (2011).** Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science* **89**, 303-309.
- Touati, D. (2000).** Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 1-6.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004).** Bacterial iron sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology* **58**, 611-647.
- Whitby, P. W., VanWagoner, T. M., Springer, J. M., Morton, D. J., Seale, T. W. & Stull, T. L. (2006).** *Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source. *Journal of Medical Microbiology* **55**, 661-668.
- Zapotoczna, M., Heilbronner, S., Speziale, P. & Foster, T. J. (2012).** Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Bacteriology* **194**, 6453-6467.

Table 1: Strains and plasmids used in this study

	Name	Relevant characteristics	Source/Reference
<i>S. xylosus</i>	C2a	derived from the type strain DSM20267 cured of its endogenous plasmid pSX267 reference strain	Götz et al, 1983 LN554884
	C2aΔ561	Isogenic mutant of <i>S. xylosus</i> C2a deleted of SXYL_00561 gene	This work
<i>E. coli</i>	Top 10	Competent strain for plasmid transformation	Invitrogen
Plasmids	pBT2	Temperature-sensitive <i>E. coli-Staphylococcus</i> shuttle vector. AmR (<i>E. coli</i>) CmR(<i>Staphylococcus</i>)	Brückner, 1997
	pSXΔ561	pBT2, SXYL_00561 [13-317]: <i>ermB</i> shuttle vector	This work
	pEC4	pBluescript KS + derivative. Source of <i>ermB</i> gene (EmR). AmR	Brückner, 1997

Table 2: PCR primers for mutagenesis

Name	Primer sequence (5'-3') ^a
Up561F1-EcoRI	CGGAATTCAACCACAGGCGGCATATAAT
Dn561R2-BamHI	CGGGATCCCTCATCGGGATTACGTCCAT
Up561R1-EmF ^b	CACAATAGAGAGATGTCACCCAATTGGACTTTGATCTAGAATACTCA
Dn561F2-EmR ^b	GGTATACTACTGACAGCTTCCGTGAAAACGGTGGAGCAACT
EmF-Up561R ^b	TGAGTATTCTAGATCAAAGTCCAATTGGGTGACATCTCTCTATTGTG
EmR-Dn561F ^b	AGTTGCTCCACCGTTTTTCACGGAAGCTGTCAGTAGTATACC
Up561F3	GCCTTACGATCGTTGGGTTA
Dn561R3	TGCACGATCAGCTATTGCAT

^a underlined regions represent restriction enzyme sequences

^b primer containing overlapping end (in bold)

Table 3: Ratio of relative expression (ferritin 5µM/FeSO₄ 50µM) of the targeted genes in *S. xylosus* C2a strain.

Locus tag	Gene	Product of targeted gene	Ratio of relative expression determined by qPCR
SXYL_00748	<i>sfaA</i>	Transporter SfaA	1.1
SXYL_00752	<i>htsB</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein HtsB	0.9
SXYL_02203	<i>fhuC</i>	ABC-type cobalamin Fe ³⁺ -siderophores transport system ATPase component, FhuC	0.8
SXYL_02116	<i>sstA</i>	Iron compound ABC transporter, permease protein SstA	1.3
SXYL_02113	<i>sstD</i>	Lipoprotein SstD	0.7
SXYL_02216	<i>sitA</i>	ABC metal ion transport system ATP-binding protein, SitA	0.1
SXYL_02217	<i>sitB</i>	Iron/manganese/zinc ABC transporter permease, SitB	0.1
SXYL_02218	<i>sitC</i>	ABC metal ion transport system extracellular binding protein, SitC	0.2
SXYL_00561	SXYL_00561	Putative reductase	22.0
SXYL_00562	SXYL_00562	Putative oxidase	24.5
SXYL_00563	SXYL_00563	Putative permease	17.3

Each data point is calculated from average of duplicate of the three biological triplicates. A gene was considered differentially expressed under ferritin-iron growth condition compared to ferrous sulphate-replete growth condition if the ratio of the relative expression was upper than 2 or lower than 0.5 as calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Table 4: Ratio of relative expression (*S. xylosus* C2aΔ561/C2a) of the targeted genes in presence of ferritin (5 μM).

Locus tag	Gene	Product of targeted genes	Ratio of relative expression determined by qPCR
SXYL_01303	<i>sodA</i>	Superoxyde dismutase, SodA	0.59
SXYL_02505	<i>katA</i>	Catalase A, KatA	0.75
SXYL_01551	<i>katB</i>	Catalase B, KatB	0.46
SXYL_02533	<i>katC</i>	Catalase C, KatC	0.37
SXYL_01572	<i>bsaA</i>	Glutathione peroxidase, BsaA	0.37
SXYL_02535	<i>ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F, AhpF	0.76
SXYL_00793	<i>dps</i>	Dps family protein, Dps	0.63
SXYL_00944	<i>ftnA</i>	Ferritin, FtnA	0.81
SXYL_00973	<i>bcp</i>	Bacterioferritin comigratory protein, Bcp	0.57

Each data point is calculated from average of duplicate of the three biological triplicates. A gene was considered differentially expressed under ferritin-iron growth condition compared to ferrous sulphate-replete growth condition if the ratio of the relative expression was upper than 2 or lower than 0.5 as calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Figure 1: Bioscreen growth curves of *S. xylosum* C2a strain in Mx0 supplemented or not with ferritin or FeSO₄

All experiments were performed in triplicate with three biological repeats; error bars are standard errors of the mean and are not visible when smaller than the symbols.

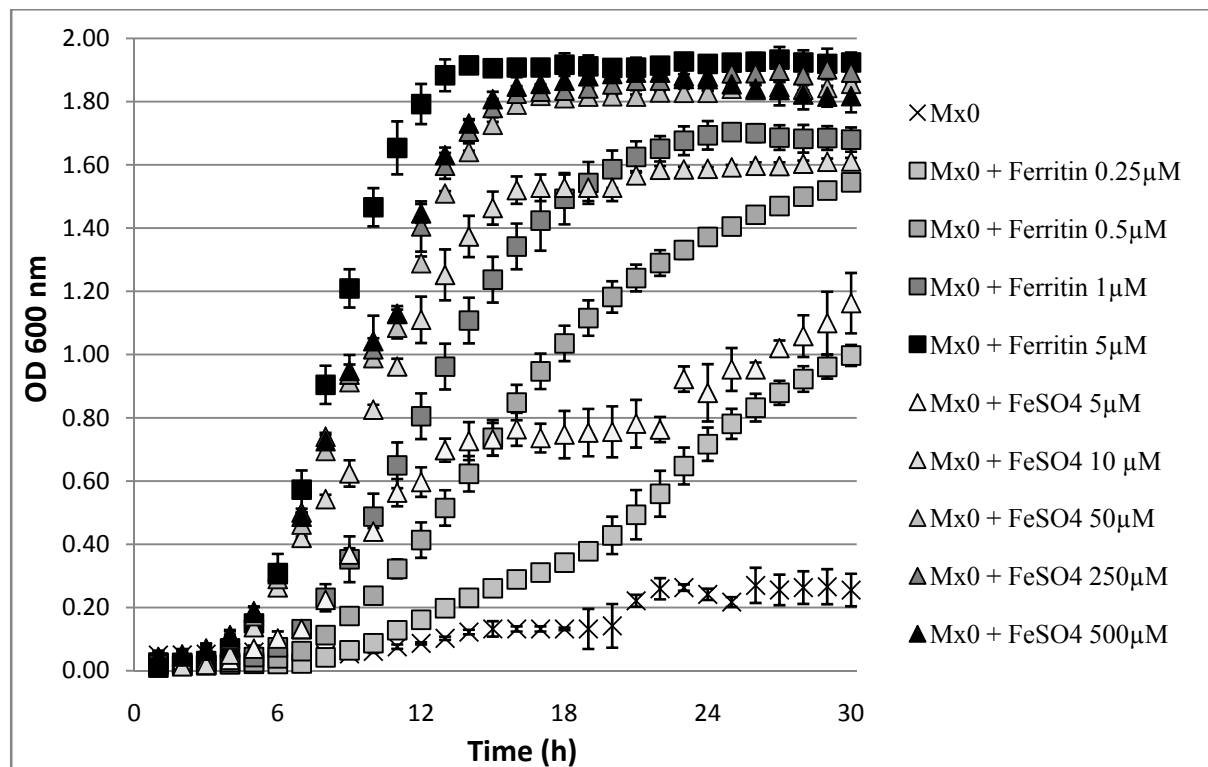


Figure 2: Co-transcription of SXYL_00561-00562 and SXYL_00562-00563 as evidence by RT-PCR mapping:

Lane 1: molecular weight marker (Promega)

Lanes 2, 5 and 8: positive controls of RT-PCR targeting the genes SXYL_00561, 00562 and 00563, respectively

Lanes 4 and 7: positive controls of PCR using genomic DNA as template, targeting the junction between SXYL_00561-00562 and SXYL_00562-00563, respectively

Lanes 3 and 6: the 310 bp and 270 bp RT-PCR products indicated a co-transcription of SXYL_00561-00562 and SXYL_00562-00563, respectively

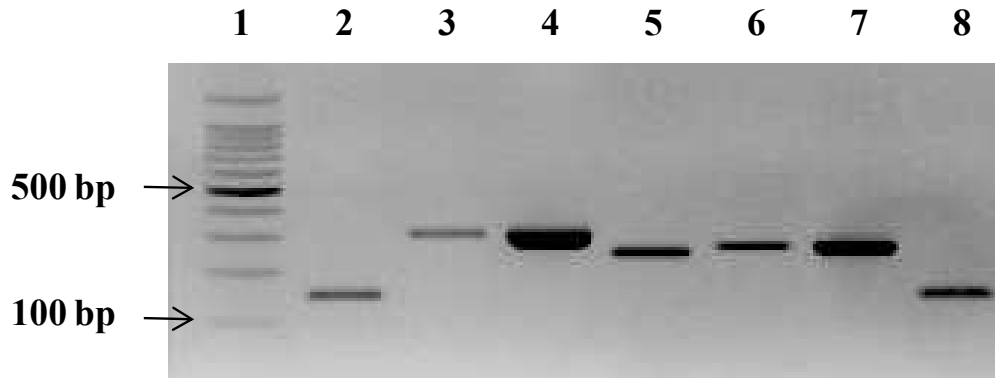
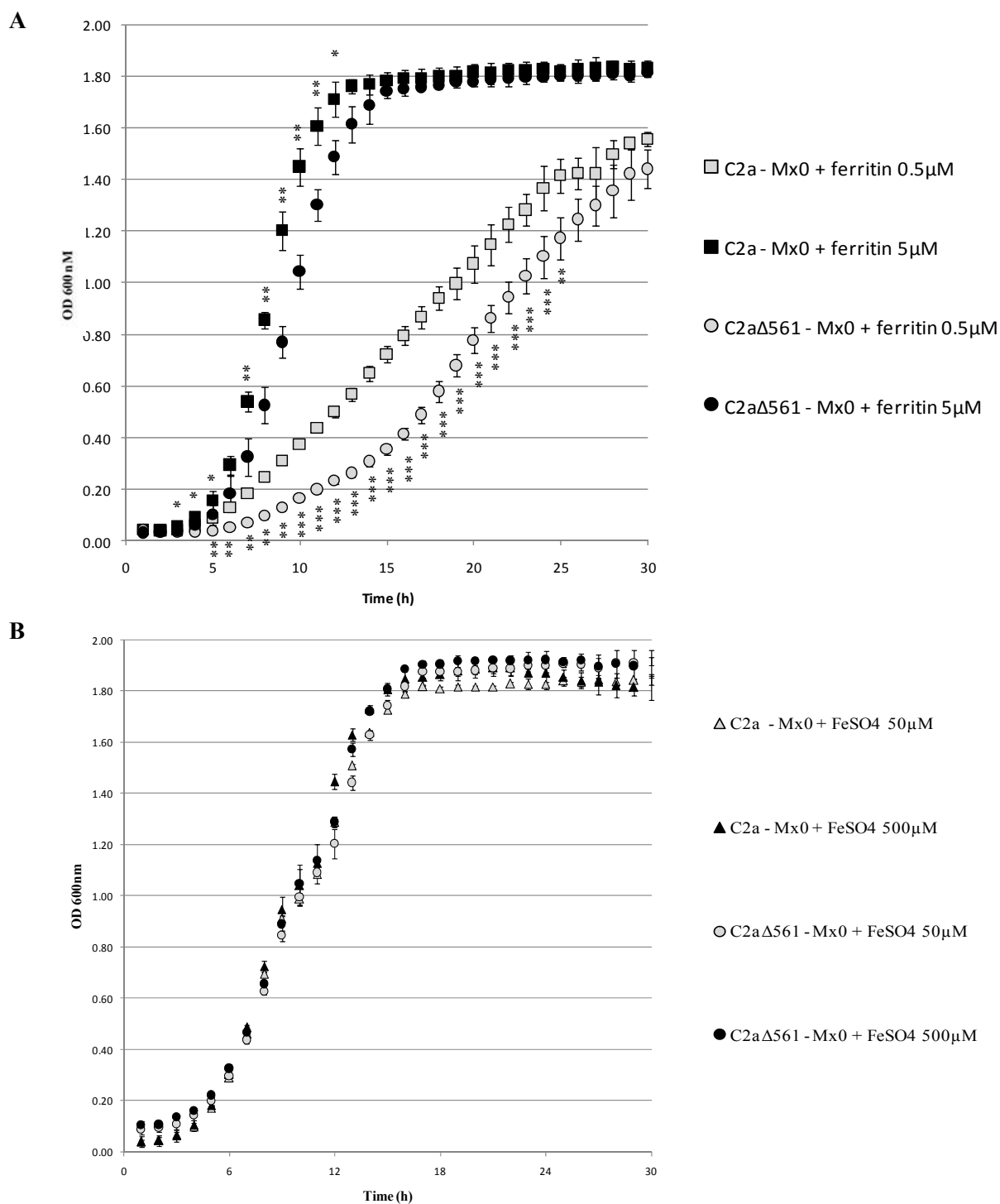


Figure 3: Bioscreen growth curves of *S. xylosus* C2a and C2aΔ561 strains in Mx0 containing ferritin (A) or FeSO₄ (B).

All experiments were performed in triplicate with three biological repeats; error bars are standard errors of the mean and are not visible when smaller than the symbols. Data were statistically analyzed following the Student t-test with differences considered significant ($p < 0.05$, *), very significant ($p < 0.01$, **) or highly significant ($p < 0.001$, ***).

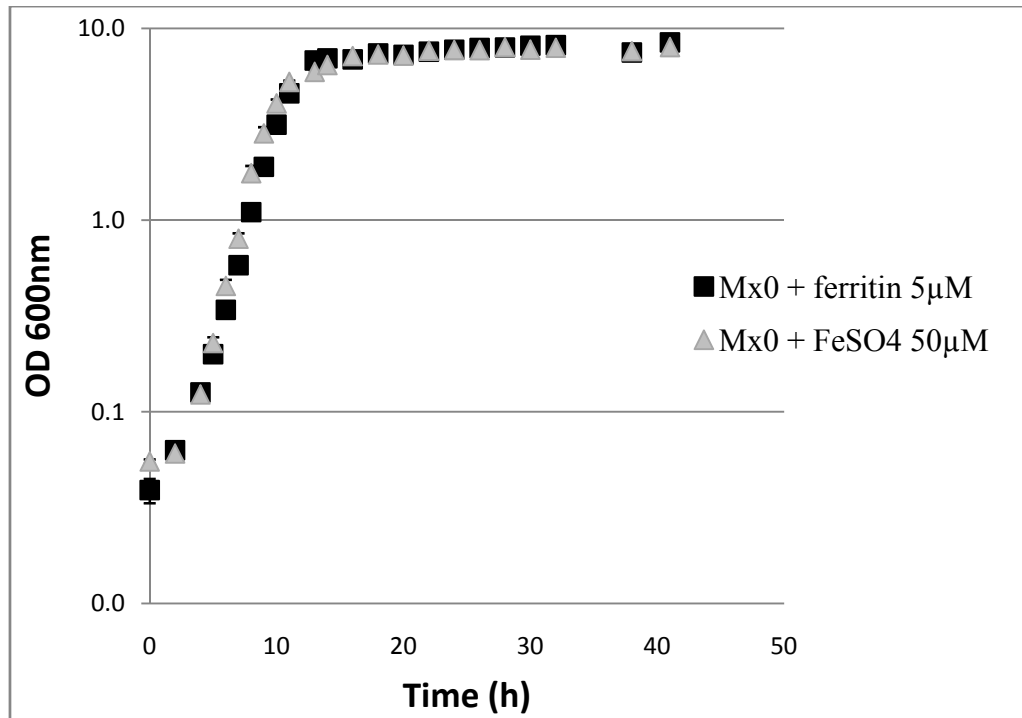


Supplementary Table S1: Primer sequences used for PCR and/or qPCR

Locus tag	Target	Sequence of primer	
		Forward	Reverse
SXYL_00561	SXYL_00561	AGGAGGAGTCATGTTACAGC	ATTCTGACTGCAAAGCTTGTG
SXYL_00562	SXYL_00562	GTTGACCTTGTTTCAGAACGAC	GTTGACCTTGTTTCAGAACGAC
SXYL_00563	SXYL_00563	GACTTACCACGCAATTGCTC	CGTAACTGAATTCAACTGCAGA
SXYL_00561- SXYL_00562	SXYL_00561/SXYL_00562	GTGAAAACGGTGGAGCAACT	GCAAGTGCAGCAAGTAGTGT
SXYL_00562- SXYL_00562	SXYL_00562/SXYL_00563	AGCTTTGCAAGCATTGAAATTG	CGACCCATCTTTGTCTGGTATT
SXYL_02216	<i>sitA</i>	ATCAACAGGCAAAGCCCA	ACATGACTACGTGCTCCAC
SXYL_02217	<i>sitB</i>	GTATGTGGAACAGTCGGCT	TTGCTACCATCCCCGTTG
SXYL_02218	<i>sitC</i>	CCAATAGGTCAAGACCCACA	TCGAACCAACCATTACCTGT
SXYL_02116	<i>sstA</i>	TCAGGTAGTACGCTAGCACT	CTGCAATACTCAAGACTACTGC
SXYL_02113	<i>sstD</i>	GTTGTCTTTGATTATGGGACTTT	GTTTAGCTTCAGCAACTTTATCG
SXYL_00748	<i>sfaA</i>	GTGTATGGGCTGGGAGTTT	CACTCATAATGCCACGACCT
SXYL_00752	<i>htsB</i>	GATGCAAGCGATGACTCGTA	GTACGCGGTTAAAGCTGGT
SXYL_02203	<i>fhuC</i>	GACGATTGCTCAAGACACT	TCATCAGAATAGCAAGACGC
SXYL_01303	<i>sodA</i>	CGCAGCAGTAGAAGGAAGT	ATGTCCACCGCCATTATTGC
SXYL_02505	<i>katA</i>	CGTCATCTTCACGAAAGTCATATTC	CGCTAGTACACATTATTATCCAAATAG
SXYL_01551	<i>katB</i>	TTCGATCATGAACGTATACCA	GTGTCCTGGTGAACCTTTAGAG
SXYL_02533	<i>katC</i>	ATTCGTGGATTTCGCATTAAAG	AGCTTCTGGTAGTGACGT
SXYL_02535	<i>ahpF</i>	AACGCACACCAAGTTTCTCA	TTAATGCTTGAACAACGTCAGG
SXYL_01572	<i>bsaA</i>	ACTGCTAGCGAATGTGGTTT	TTGTGTTGCTTCTTCTCCGT
SXYL_00793	<i>dps</i>	ACTGGACAGTAGCATTACCC	CTGGATTACCACCTGTTGCT
SXYL_00944	<i>ftnA</i>	GGCTATGGCTGCTTTCTGT	TCTTGTCTTTCGCTAAACC
SXYL_00973	<i>bcp</i>	ACACACCAACATGTACTACGG	CAATACCCATTGATTCTTTGCCA

Supplementary Figure S1: Growth of *S. xylosus* C2a in Mx0 containing ferritin (5 μ M) or FeSO₄ (50 μ M).

All experiments were performed with three biological repeats; error bars are standard errors of the mean and are not visible when smaller than the symbols.



DISCUSSION

Comme beaucoup d'autres espèces du genre *Staphylococcus*, *S. xylosus* est une espèce commensale de l'épithélium et des muqueuses des animaux et plus particulièrement des mammifères (Kloos *et al.*, 1976; Nagase *et al.*, 2002). *S. xylosus* est une des trois espèces fréquemment isolées des produits carnés et laitiers naturellement fermentés (Coton *et al.*, 2010; Leroy *et al.*, 2010). Il est utilisé comme ferment dans la viande pour son rôle dans la flaveur et dans la couleur de ces produits (Talon & Leroy, 2011). Concernant la flaveur, il catabolise notamment la leucine en acide 3-méthyl butanoïque qui donne une note aromatique fromagère (Beck *et al.*, 2004). Il limite l'oxydation des acides gras insaturés via ses propriétés antioxydantes résultant notamment des activités de la superoxyde dismutase et de la catalase A comme cela a été décrit chez la souche *S. xylosus* C2a (Barrière *et al.*, 2001b; Barrière *et al.*, 2002). Chez cette souche, il a été mis en évidence la présence de deux autres catalases qui pourraient également jouer un rôle anti oxydant dans les produits carnés (Planchon *et al.*, 2007; Planchon *et al.*, 2009). *S. xylosus* a été bien caractérisé *in vitro* sur la base de ses propriétés technologiques (Talon *et al.*, 2002) mais les mécanismes moléculaires mis en place par cette bactérie pour s'adapter à la matrice carnée restent méconnus. Nous avons donc étudié le transcriptome de la souche *S. xylosus* C2a dans un modèle viande jusqu'à 72 heures d'incubation dans des conditions qui miment l'étape de fermentation. Une puce à ADN spécifique de cette souche a été utilisée. Nous avons pris comme référence l'inoculum préparé en milieu chimiquement défini minimum, condition de préculture très favorable à la croissance en modèle viande.

Près de 55 % des gènes de *S. xylosus* voient leur expression modifiée dans le modèle viande. Parmi ces gènes, 50 % sont communs aux trois temps d'incubation (24, 48 et 72 h). Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de focaliser notre analyse sur ces 719 gènes. Malgré un arrêt de croissance après 24 h d'incubation, *S. xylosus* reste métaboliquement actif jusqu'à 72 h comme en témoigne la surexpression de 9 gènes codant des protéines ribosomales et de 10 gènes impliqués dans la réplication ou la recombinaison de l'ADN. Chez *L. lactis*, l'augmentation de la vitesse de croissance s'accompagne d'une surexpression de ces gènes dont une surexpression massive de 44 gènes codant des protéines ribosomales en phase exponentielle de croissance (Dressaire *et al.*, 2008). Par contre, en phase stationnaire, *L. lactis* sous exprime dès 24 h des gènes codant des protéines ribosomales en matrice fromagère (Cretenet *et al.*, 2011).

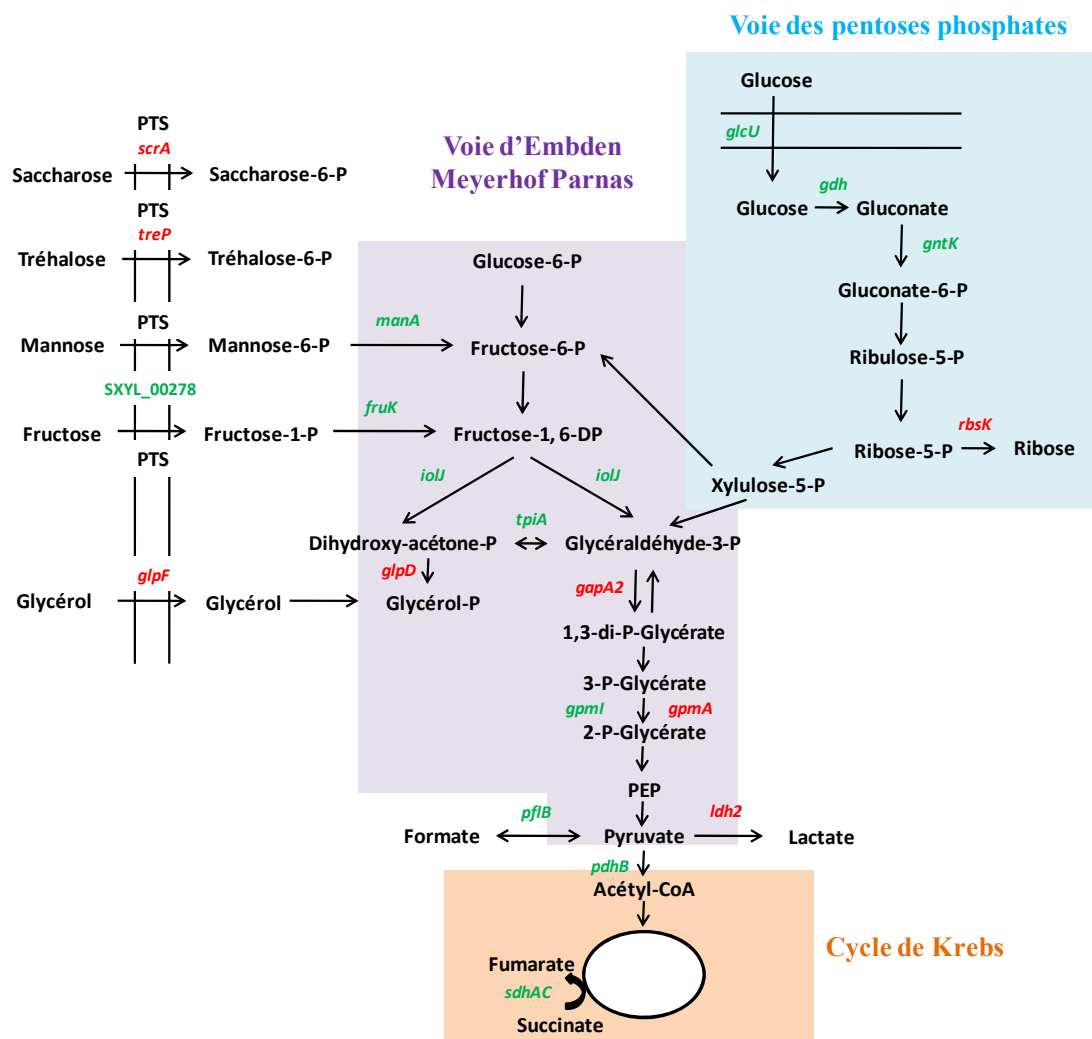


Figure 36: Gènes liés au métabolisme des glucides et différemment exprimés chez *S. xylosus* lors de sa survie dans le modèle viande

En vert : les gènes surexprimés, en rouge : les gènes sous exprimés

Les voies centrales pour métaboliser le glucose chez les staphylocoques sont les voies d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) et des Pentoses Phosphates (PP) (Brückner & Rosentein, 2006). Dans la viande, *S. xylosus* catabolise le glucose via la voie des PP pour sa survie en phase stationnaire. Les gènes impliqués dans l'acquisition du glucose (*glcU*) et dans le catabolisme du gluconate (*gdh*, *gntR* et *gntK*) sont fortement surexprimés (Figure 36). Chez *S. xylosus*, les gènes *glcU* et *gdh* sont co-localisés suggérant que GlcU recrute du glucose pour la glucose déshydrogénase (Fiegler *et al.*, 1999). A l'inverse, les gènes *trp*, *scrA*, *glpF* et *glpD* codant des systèmes PTS spécifiques du tréhalose, du sucrose et impliqués dans le transport et le catabolisme du glycérol, respectivement, sont sous exprimés via l'action probable du régulateur CcpA (Brückner & Titgemeyer, 2002) (Figure 36). La production de gluconate apparaît comme une façon alternative de fournir de l'énergie à partir du glucose. L'organisation génétique du cluster de gènes *gntR*, *gntK*, *gntP* codant un régulateur, une kinase et une perméase est similaire à celui identifié chez *B. subtilis* (Fujita *et al.*, 1986). L'opéron *gnt* est négativement régulé par GntR chez *B. subtilis* (Yoshida *et al.*, 1995). GntR est régulé par le gluconate. L'opéron *gnt* est aussi sujet à la répression catabolique du carbone par CcpA (Reizer *et al.*, 1996). Dans nos conditions, le catabolisme se poursuit via la glycolyse avec cinq gènes surexprimés (*manA*, SXYL_00278, *iolJ*, *tpiA* et *gpml*) (Figure 36). Enfin, le pyruvate serait catabolisé en formate et acétyl-coA plutôt qu'en lactate (Figure 36). L'acétyl-coA peut alimenter le cycle TCA et la chaîne respiratoire. Ainsi, les gènes *sdhAC* impliqués dans ces deux voies sont également surexprimés (Figure 36). Finalement, 8 gènes (*atpABCDEFGH*) codant les différentes sous unités de l'ATP synthase sont surexprimés. Cette ATP synthase pourrait contribuer à fournir de l'énergie à *S. xylosus* pour sa survie dans le modèle viande.

La surexpression de plusieurs gènes impliqués dans les voies d'EMP et des PP, des gènes *narHJ* et du gène *pflB* codant la nitrate réductase et la formate acétyltransférase, respectivement, suggère des conditions de croissance anaérobie. En parallèle, la surexpression du gène *pdhB* codant la sous unité β de la pyruvate déshydrogénase suggère des conditions de croissance plutôt aérobie. Les concentrations en oxygène dans le modèle viande sont sans doute très hétérogènes et *S. xylosus* doit faire face à des gradients en oxygène.

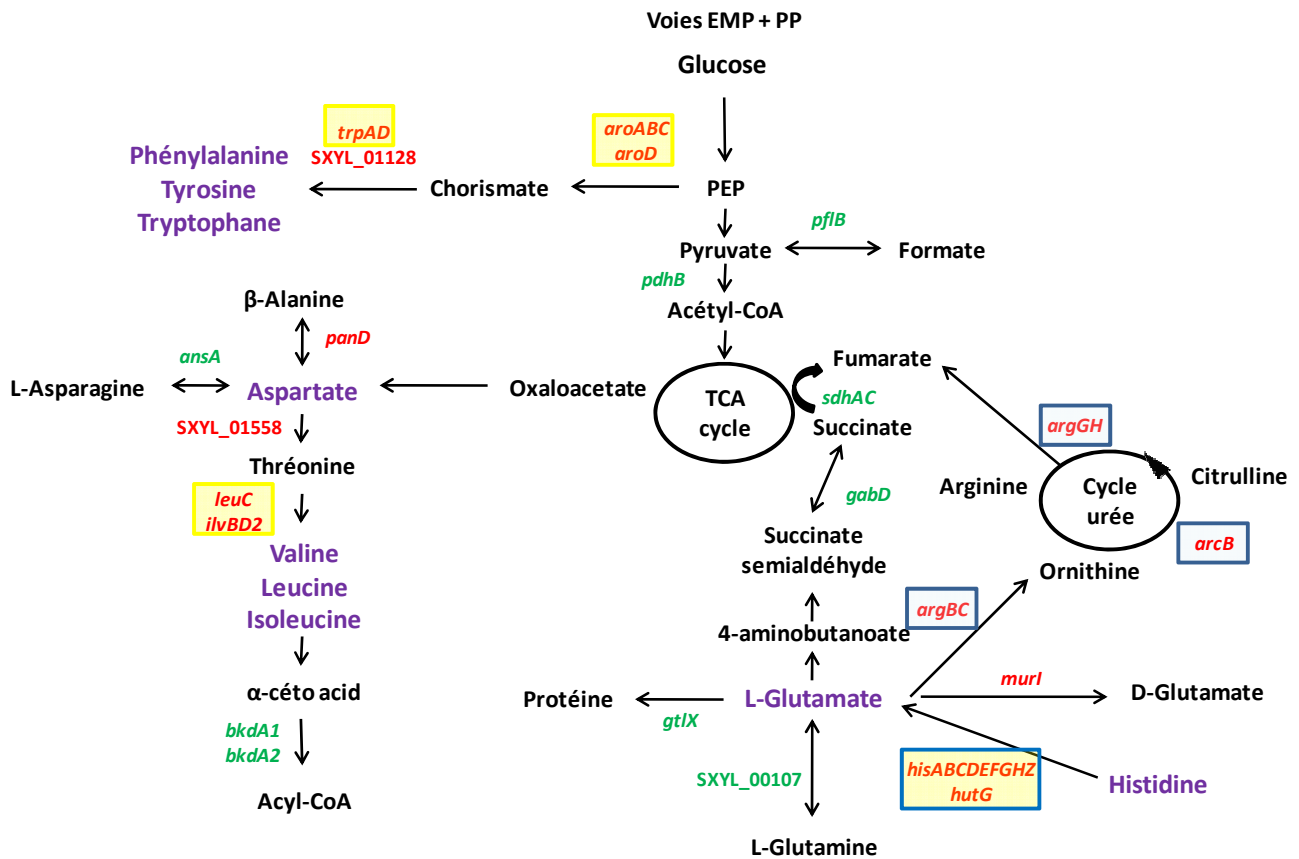


Figure 37: Gènes liés au métabolisme des acides aminés et différentiellement exprimés chez *S. xylosus* lors de sa survie dans le modèle viande

En vert : les gènes surexprimés, en rouge : les gènes sous exprimés, en violet : les acides aminés présents dans la viande, encadrés en jaune : les gènes régulés par CodY, encadrés en bleu : les gènes régulés par CcpA

Les protéines font partie des principaux composants de la viande (Lafarga & Hayes, 2014). Les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires sont hydrolysées durant l'étape de fermentation et de maturation des produits carnés fermentés (Hughes *et al.*, 2002). La dégradation initiale est essentiellement due à l'activité de protéinases endogènes qui relarguent des peptides pouvant être hydrolysés par des enzymes bactériens (Hughes *et al.*, 2002). Dans notre étude, *S. xylosus* surexprime 4 gènes (SXYL_01247, SXYL_01248, *ampS* et *map*) qui codent des peptidases. Ces peptidases pourraient fournir des acides aminés libres à *S. xylosus*. Les mélanges de ferment tels que *Lactobacillus sakei* et *S. carnosus* ou *Pediococcus pentosaceus* et *S. xylosus*, peuvent influencer les activités protéolytiques et relarguer des acides aminés dans les saucissons (Aro Aro *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2002). Chez *L. sakei*, 4 peptidases ont été identifiées dont 2 dipeptidases qui sont surexprimées en présence de protéines sarcoplasmiques et une peptidase (PepR) surexprimée dans un milieu viande (Champomier-Vergès *et al.*, 2002; Fadda *et al.*, 2010). Un large éventail d'acides aminés, avec des teneurs variables, est présent dans les mêlées de saucisson (Aro Aro *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2002). Dans le modèle viande, nous pouvons supposer que des acides aminés libres sont disponibles pour *S. xylosus* ce qui se traduit par la sous expression de 24 gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés ramifiés (*leuC*, *ilvB*, *ilvD2*), des acides aminés aromatiques (*aroABC*, *trpA*, *aroD*, SXYL_01128), de l'arginine (*argGH*, *arcB*, *argC*, *argB*) et de l'histidine (*hisABCDIEFGZ*, *hutG*) (Figure 37). Chez *S. aureus*, CodY contribue à la régulation de plus de 200 gènes incluant la plupart des gènes cités précédemment (Majerczyk *et al.*, 2010). CodY est un répresseur global de la transcription qui contrôle les gènes impliqués dans l'utilisation de l'azote. Chez *S. aureus* et *B. subtilis*, CodY est activé par des taux élevés de GTP. Les acides aminés ramifiés augmentent également l'affinité de CodY pour ses gènes cibles (Majerczyk *et al.*, 2010; Shivers & Sonenshein, 2004). Chez *B. subtilis*, l'opéron *hut* impliqué dans l'utilisation de l'histidine est régulé par CodY et CcpA (Bender, 2012). Par ailleurs, *S. xylosus* sous exprime 6 gènes impliqués dans la synthèse de l'arginine (*argB*, *argC*, *arcB*, *argGH*, *proC*) (Figure 37). Chez *S. aureus*, les gènes impliqués dans cette synthèse sont régulés par CcpA (Nuxoll *et al.*, 2012).

Si les gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés ramifiés sont sous exprimés, deux autres gènes impliqués dans leur catabolisme sont surexprimés. Il s'agit des gènes *bkdA1* et *bkdA2* qui codent les deux sous unités de la cétoacide déshydrogénase (Figure 37). Le catabolisme de la leucine chez *S. xylosus* est impliqué dans le développement de la flaveur des produits carnés fermentés dû à la production de méthyl -aldéhyde et -acide sous l'action

notamment de la BkdA (Beck *et al.*, 2004). L'acide 3-méthyl butanoïque est le dérivé majeur de ce catabolisme, sa production est initiée en milieu de laboratoire en phase stationnaire de croissance (Beck *et al.*, 2004).

Enfin, sept gènes impliqués dans le métabolisme de l'aspartate et du glutamate sont différentiellement exprimés (Figure 37). Concernant l'aspartate, le gène *ansA* codant une L-asparaginase est sur exprimé. Cette activité pourrait fournir du NH₄ comme source d'azote. Le gène *ansA* pourrait être induit par la présence d'aspartate dans le modèle viande car chez *B. subtilis*, l'opéron *ans* est induit en présence de ce composé (Sun & Setlow, 1993). Chez *L. sakei*, ce gène (*asnA2*) est induit durant sa croissance dans un milieu modèle viande et un mutant de ce gène a une croissance réduite (Hufner *et al.*, 2007). Concernant le glutamate, chez *S. xylosus*, les gènes *gabD* et SXYL_00107, co-localisés, codent respectivement une succinate semi aldéhyde déshydrogénase et une glutamine synthétase et sont très fortement surexprimés. Le glutamate et la glutamine servent de donneurs de groupement NH₄ pour de nombreux composés contenant de l'azote. Il s'agit de métabolites clés servant de lien entre le métabolisme de l'azote et du carbone (Feehily & Karatzas, 2013). Le glutamate sert aussi d'osmoprotectant chez certaines bactéries (Saum *et al.*, 2006). Chez *B. subtilis*, l'opéron *glnAR* code la glutamine synthase et son régulateur (Gunka & Commichau, 2012). *Halobacillus halophilus* a deux glutamine synthases, GlnA1 codée par le gène *glnA1* organisé en opéron avec *glnR* et GlnA2 codée par *glnA2*. Chez cette espèce, seule l'expression de *glnA2* est augmentée en présence de NaCl (Saum *et al.*, 2006). Chez *S. xylosus*, comme chez *H. halophilus*, deux gènes codant des glutamine synthases ont été identifiés. Par contre chez *S. xylosus*, l'équivalent du gène *glnA2* (SXYL_00107) forme un cluster avec le gène *gabD*, ce qui n'avait pas encore été décrit chez d'autres espèces. La surexpression de ce cluster pourrait ainsi être liée au stress osmotique généré par la présence de sel dans le modèle viande.

S. xylosus doit s'adapter à une concentration en chlorure de sodium dans le modèle viande supérieure à celle du milieu de culture utilisée pour la préparation de l'inoculum (0.47 M contre 0.02 M). L'osmotolérance est une des caractéristiques des staphylocoques (Kuroda *et al.*, 2005). *S. xylosus* répond à la présence de NaCl en sous exprimant le gène *mscL* qui code un canal mécanosensible à large conductance et prévient l'efflux de soluté (Figure 38).

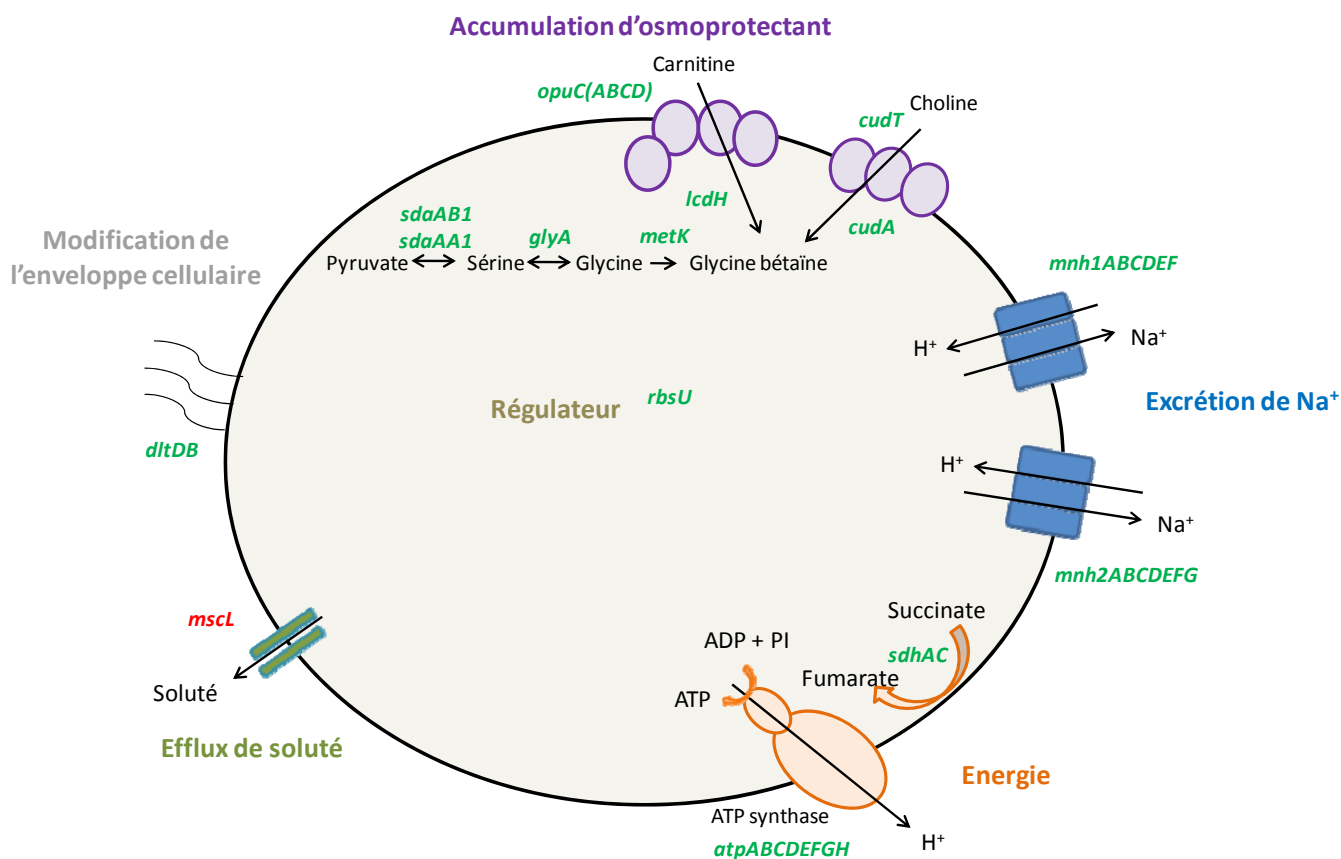


Figure 38: Gènes liés à l'osmoprotection et différenciellement exprimés chez *S. xylosus* lors de sa survie dans le modèle viande

En vert : les gènes surexprimés, en rouge : les gènes sous exprimés

Chez *Enterococcus faecalis*, la sous expression de ce gène est simultanée à l'expression de gènes impliqués dans l'accumulation de potassium (Solheim *et al.*, 2014). Dans nos conditions, différents mécanismes d'accumulation d'osmoprotectants, d'excrétion de Na^+ et de modification de l'enveloppe cellulaire pourraient être mis en jeu. Ainsi, *S. xylosus* pourrait mettre en œuvre deux systèmes de transport et trois systèmes de synthèse de la glycine bêtaïne, un osmoprotectant majeur. Le cluster *opuC(ABCD)* et le gène *lcdH* sont fortement surexprimés en modèle viande (Figure 38). Le cluster *opuC* code un transporteur bêtaïne/carnitine/choline de type ABC. Ce système a été identifié chez *B. subtilis* et chez *L. monocytogenes* comme la seule voie permettant de faire entrer de la carnitine (Angelidis & Smith, 2003; Kappes & Bremer, 1998). Dans la viande, les concentrations en L-carnitine sont très variables allant de 6.5 à 87.7 mg/100g (Demarquoy *et al.*, 2004). Dans notre étude, la L-carnitine pourrait être catabolisée en glycine bêtaïne par la L-carnitine déshydrogénase codée par le gène *lcdH*. En parallèle, les gènes *cudT* et *cudA* sont surexprimés. Chez *S. xylosus*, ces gènes codent des enzymes impliqués dans l'acquisition de la choline et sa déshydrogénation en glycine bêtaïne (Rosenstein *et al.*, 1999). Enfin, les gènes *sdaAA1*, *sdaAB1* et *glyA* qui codent des enzymes impliqués dans la synthèse de glycine et le gène *metK* qui code une S- adénosyl-méthionine servant de donneur de groupement méthyl pour la synthèse de glycine bêtaïne sont surexprimés chez *S. xylosus* (Figure 38). Deux clusters *mnh* codant des systèmes antiporteurs Na^+/H^+ sont surexprimés par *S. xylosus* dans le modèle viande (Figure 38). Chez *S. aureus*, la surexpression de ces deux clusters engendre une augmentation de la transcription des gènes de la chaîne respiratoire (Swartz *et al.*, 2007). De façon similaire chez *S. xylosus*, nous observons une surexpression du gène *sdh* et des gènes impliqués dans la synthèse des sous unités de l'ATP synthase (Figure 38). Cette ATPase génère une force proton-motrice qui expulse les protons importés par les systèmes Mnh afin de maintenir l'homéostasie du pH cellulaire (Morino *et al.*, 2014). Par ailleurs, le degré de D-alanylation des acides teichoïques varie selon les conditions environnementales (Neuhaus & Baddiley, 2003). Chez *S. aureus*, cette estérification diminue avec l'augmentation du pH, de la température ou du sel (Neuhaus & Baddiley, 2003). Chez cette espèce, l'expression des gènes *dlt*, codant des protéines impliquées dans l'estérification, est réprimée en réponse à de fortes concentrations en sel (Koprivnjak *et al.*, 2006). Chez *S. xylosus*, la surexpression des gènes *dltB* et *dltD* pourrait être la résultante du pH acide modéré du modèle viande (5,9 – 5,7) et de la concentration en sel assez élevée (0,47 M) (Figure 38). Le gène *rsbU* est surexprimé alors que les gènes *rsbV* et *rsbW* sont sous exprimés chez *S. xylosus* dans le modèle viande (Figure 38). Ces trois gènes appartiennent au cluster sigma B, comme chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Knobloch *et al.*,

2001). Le gène *rsbU* codant la sérine phosphatase régulateur de la sous unité sigma B est surexprimé en présence de sel chez *S. epidermidis* en biofilm (Knobloch *et al.*, 2001).

S. xylosus est utilisé comme ferment dans les produits carnés essentiellement pour sa capacité à réduire le nitrate en nitrite. En effet, dans ces produits il est d'usage d'ajouter du nitrate et du nitrite. Le nitrate est réduit en nitrite qui est lui-même réduit par diverses réactions chimiques en monoxyde d'azote (NO) qui interagit avec l'hème de la myoglobine pour former un pigment rouge et stable dans le temps : la nitrosomyoglobine (Gøtterup *et al.*, 2007). Les quantités ajoutées et résiduelles de nitrate et de nitrite sont strictement réglementées par la directive européenne 2006/52/EC. Même si les composés nitrosés sont utilisés de façon industrielle depuis le début du 20^{ème} siècle, leur impact sur la physiologie des ferments est toujours méconnu. Nous avons voulu caractériser par une approche transcriptomique globale, les effets combinés du nitrate et du nitrite aux concentrations utilisées dans l'industrie sur la physiologie de la souche *S. xylosus* C2a en modèle viande.

Dans le modèle viande, la croissance de *S. xylosus* C2a est similaire en présence ou non de nitrate et de nitrite. Le dosage de ces composés dans le modèle viande a révélé que le nitrate est réduit en nitrite dès 24 h d'incubation sous l'influence de l'activité nitrate réductase de *S. xylosus*. L'expression du locus *nar* codant la nitrate réductase n'est pas modifiée ce qui n'est pas surprenant car comme nous l'avons observée, la réduction du nitrate en nitrite est terminée après 24 h.

Près de 24% des gènes de *S. xylosus* C2a ont leur expression modifiée en présence de nitrate et de nitrite. En fait, le nitrite subit des réactions chimiques qui conduisent à la formation d'espèces réactives de l'azote (RNS), incluant le monoxyde d'azote, ce qui génèrent un stress nitrosant. *S. xylosus* répond à ce stress, très similaire au stress oxydant, en mettant en œuvre différents mécanismes impliqués principalement dans l'homéostasie du fer et sa régulation, la défense contre le stress oxydant et sa régulation et la réparation de l'ADN et des protéines (Figure 39).

S. xylosus répond à la présence de RNS par la surexpression de 17 gènes impliqués dans l'acquisition du fer. La plupart sont liés à la production ou l'acquisition de sidérophores (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*) (Figure 39). Deux sidérophores peuvent être produits par *S. aureus* : la staphyloferrine A et la staphyloferrine B (Beasley & Heinrichs, 2010; Saha *et al.*, 2013; Sheldon & Heinrichs, 2012). Chez *S. xylosus*, les gènes *sfaABCD* et *htsABC*, impliqués dans

la synthèse de la staphyloferrine A et son transport ont été identifiés, ils sont similaires à ceux identifiés chez *S. aureus*. *S. xylosus* possède également les gènes *fhuCBG-D1-D2* et *sstABCD* qui codent respectivement des transporteurs de sidérophores de type hydroxamate et catécholate. Les staphylocoques ne synthétisent pas de sidérophores de type hydroxamate et catécholate mais ils sont toutefois capables d'acquérir ces sidérophores (Beasley & Heinrichs, 2010). Le gène *fntA* impliqué dans le stockage du fer et codant une ferritine est également surexprimé. Le fer est un nutriment essentiel mais de fortes concentrations sont toxiques pour les bactéries, les concentrations en fer soluble doivent donc être finement régulées. Chez les bactéries, le régulateur Fur fonctionne comme un répresseur transcriptionnel. Les gènes impliqués dans l'acquisition du fer qui sont sous la dépendance de Fur possèdent des Fur box et ont été particulièrement bien étudiés chez *S. aureus* (Sheldon and Heinrichs, 2012). Nous avons identifié des Fur box en amont des gènes *htsA*, *sstA*, *fhuC*, *fhuD1*, *fhuD2* chez *S. xylosus*. L'activité de Fur ne dépend pas seulement du fer mais aussi de l'environnement oxydant (Fillat, 2014). Il a été montré que le NO et les peroxydes pouvaient moduler son activité (Spiro, 2007). Le NO peut réagir avec le fer du complexe Fur-fer et empêcher l'interaction du complexe avec l'ADN (D'Autreaux *et al.*, 2002). Les gènes sous la dépendance de Fur et notamment les gènes liés à l'homéostasie du fer, ne sont ainsi plus réprimés chez *S. xylosus* (Figure 39). Ceci a également été montré chez *E. coli* et *S. aureus* en réponse à un stress nitrosant (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2006).

S. xylosus surexprime 12 gènes impliqués dans les mécanismes de protection et de détoxification contre le stress nitrosant (Figure 39). Parmi ceux-ci, deux gènes *katB* et *katC* codant des catalases, sont surexprimés. La majorité des staphylocoques a une catalase unique comme chez *S. aureus* (Gaupp *et al.*, 2012). La souche *S. carnosus* TM300 et certaines souches de *S. xylosus*, *S. saprophyticus* et *S. equorum* ont été décrites comme ayant deux catalases (Blaiotta *et al.*, 2010; Rosenstein *et al.*, 2009). Chez la souche *S. xylosus* C2a, trois catalases ont été identifiées. Dans cette souche, la transcription de *katA* est induite en entrée de phase stationnaire par l'oxygène et le peroxyde d'hydrogène (Barrière *et al.*, 2002). Dans nos conditions, ce gène est sous exprimé. En analysant les protéomes de *S. xylosus* C2a, deux autres catalases ont été identifiées et nommées KatB et KatC (Planchon *et al.*, 2007; Planchon *et al.*, 2009). D'après nos résultats, ces deux catalases pourraient contribuer à lutter contre le stress nitrosant dans le modèle viande.

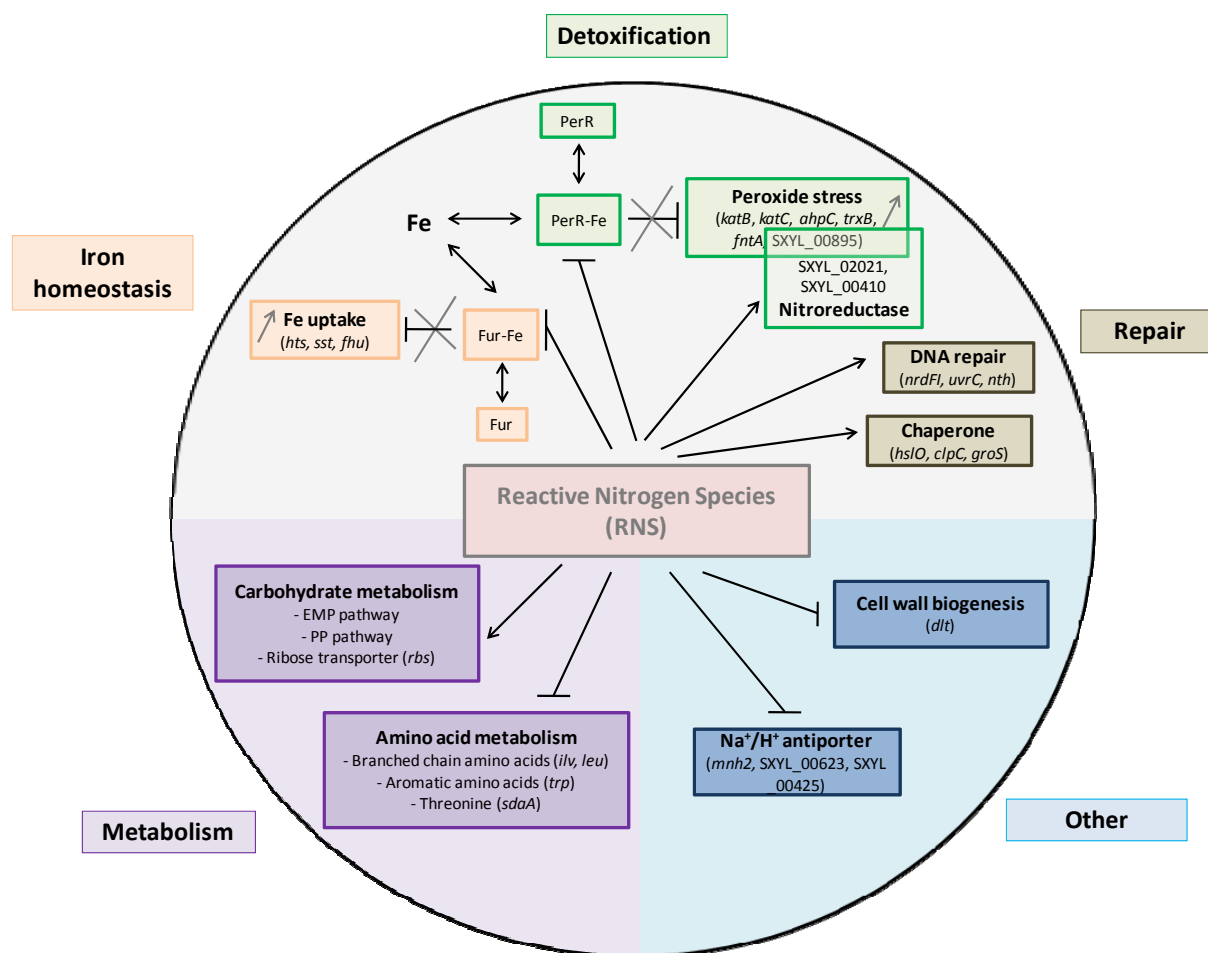


Figure 39: Résumé des voies principales et leur régulation affectées par le stress nitrosant chez *S. xylosus* en modèle viande

Les gènes *ahpC*, *trxB* et *bsaA* sont surexprimés. Ils codent l'alkyl hydroperoxide réductase (AhpC), la thiorédoxine réductase B (TrxB) et la glutathion peroxydase (BsaA) qui confèrent une résistance plus globale aux peroxydes (Gaupp et al., 2012). Le gène *bcp* est également surexprimé. Il code la protéine Bcp (pour « Bacterioferritin comigratory protein ») qui est homologue à une thiorédoxine réductase. Elle est impliquée dans la réduction des peroxydes et fonctionne également comme un chélateur de fer (Gaupp et al., 2012). Nous avons identifié des PerR box en amont des gènes *perR*, *fur*, *ahpC*, *katB*, *katC*, *trxB*, *ftrA* et SXYL_00895 chez *S. xylosus* (Figure 39). Chez *S. aureus*, le régulateur PerR régule les gènes codant des enzymes ayant une action anti-oxydante et des protéines de stockage du fer (Gaupp et al., 2012; Horsburgh et al., 2001a). PerR est un membre de la famille Fur, son activité est sous la dépendance d'ions métalliques (Horsburgh et al., 2001a). Ce régulateur comprend un domaine de liaison à l'ADN contenant du fer ou du manganèse. Lorsqu'il est actif, il agit comme un répresseur de la transcription en se fixant aux Per box. Chez *S. aureus*, il a été montré que les radicaux libres oxydent les résidus fer du complexe Per-Fe diminuant ainsi sa capacité de fixation à l'ADN (Gaupp et al., 2012; Horsburgh et al., 2001a). Dans nos conditions, nous avons vu que le régulateur Fur était inactivé conduisant probablement à une augmentation de la concentration en fer intracellulaire et favorisant la forme PerR-fer sensible au stress nitrosant. Le complexe PerR-fer-NO ne peut ainsi plus se fixer à l'ADN et les gènes sous sa dépendance ne sont plus réprimés. Les gènes SXYL_00895, SXYL_02021 et SXYL_00410 codant trois nitroréductases putatives sont surexprimés chez *S. xylosus* en présence de RNS (Figure 39). Les nitroréductases sont réparties en trois classes : la classe A représentée par NfsA chez *E. coli* et incluant la protéine NfrA de *S. aureus*, la classe B représentée par NfsB et la classe C incluant la protéine NtrA de *S. aureus* (Tavares et al., 2009). NfrA est une oxydase mononucléotide dépendante du NADP qui est impliquée dans la réponse au stress oxydant (Streker et al., 2005). La transcription de *nrfA* est fortement induite par l'H₂O₂ et le diamide, un oxydant spécifique des groupements soufrés. Une Per box a été identifiée en amont de ce gène chez *S. aureus* (Streker et al., 2005). Chez *S. xylosus*, un site potentiel d'accrochage de PerR a été retrouvé en amont de SXYL_00895. Le gène SXYL_02021 a une forte similarité avec le gène *ntrA*. Il a été montré que NrtA possède une activité glutathion réductase chez *S. aureus* (Tavares et al., 2009).

Le stress nitrosant peut générer des dommages au niveau de l'ADN. Les gènes *nrdI* et *nrdF* codant des ribonucléosides réductases sont surexprimés dans nos conditions (Figure 39). Chez *S. aureus*, ces deux gènes forment un opéron avec *nrdE* (Masalha et al., 2001). Les protéines

NrdE et NrdF peuvent fonctionner avec la thiorédoxine réductase comme donneur d'hydrogène (Rabinovitch *et al.*, 2010). Chez *E. coli*, l'expression de l'opéron *nrdHIEF* est induite en réponse au stress oxydant (Martin & Imlay, 2011). Dans notre étude, une réponse similaire est mise en place sous l'action d'un stress nitrosant. Le gène *nth* codant une endonucléase de type III et le gène *uvrC* codant la protéine C du système UvrABC sont surexprimés chez *S. xylosus* (Figure 39). Chez *E. coli*, les lésions générées par le radical OH[•] sont reconnues par des endonucléases de types III et IV (Wallace, 1988). Chez *S. aureus*, le système UvrABC est impliqué dans la réparation et l'excision des nucléotides (Ambur *et al.*, 2009). Les chaperonnes et les protéases ATP dépendantes jouent un rôle majeur dans la survie des bactéries dans des conditions de stress entraînant des agrégations ou des défauts de repliement des protéines (Ilbert *et al.*, 2007). Chez *S. xylosus*, le stress nitrosant augmente l'expression de trois gènes codant, respectivement, deux chaperonnes et une protéase : *hslO*, *clpC* et *groS* (Figure 39). Chez *S. aureus*, ces gènes sont surexprimés dans différentes conditions de stress (Ilbert *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2008).

Les espèces réactives de l'azote peuvent interagir avec de nombreuses cibles et ainsi altérer les enzymes contenant des groupements soufrés, des centres métalliques ou des résidus tyrosine (Gaupp *et al.*, 2012). Ces altérations génèrent des modifications de concentrations des métabolites et du potentiel redox agissant sur des régulateurs qui vont moduler l'expression de gènes cibles. Ainsi, *S. xylosus* s'adapte en modulant de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des glucides ou des acides aminés (Figure 39). *S. xylosus* module l'expression de 15 gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des glucides (Figure 39). Quatre gènes codent des systèmes de transport des glucides (PST) et cinq interviennent dans les voies d'EMP ou des PP. Trois gènes codant des enzymes impliqués dans le métabolisme du ribose sont surexprimés alors que trois gènes codant des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'arabinose sont sous exprimés en présence de RNS. Ces gènes sont sous la régulation transcriptionnelle de CcpA (Brückner & Titgemeyer, 2002). *S. xylosus* module également l'expression de 19 gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés (Figure 39). Huit gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés ramifiés (leucine, valine, isoleucine) et six gènes codant des enzymes impliquées dans la synthèse du tryptophane sont sous exprimés. Comme nous l'avons vu dans le modèle viande, ces gènes sont réprimés par le régulateur CodY. D'autres études ont montré par ailleurs que le nitrate et le nitrite inhibaient la dégradation de la leucine chez *S. xylosus* dans la viande et en milieu de laboratoire (Moller *et al.*, 1998; Olesen *et al.*, 2004b). Enfin, cinq

gènes impliqués dans le métabolisme de la sérine, de la glycine et de la thréonine sont modulés. Les gènes *sdaAA* et *sdaAB1* sont sous exprimés, ils codent deux sous unités de l'enzyme L-sérine-déshydratase appartenant au groupe des enzymes fer-soufre.

Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants dont les bactéries. C'est un cofacteur majeur pour de nombreuses enzymes impliqués dans des processus cellulaires indispensables tels que la respiration, la réplication de l'ADN, la synthèse d'acides aminés et le transport d'électrons (Andrews *et al.*, 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004). Le fer est généralement complexé à des protéines telles que la transferrine et la ferritine par une liaison directe avec les acides aminés, ou bien indirecte par l'intermédiaire de l'hème, dans les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine). Les staphylocoques ont développé plusieurs mécanismes leur permettant d'acquérir du fer (Sheldon & Heinrichs, 2012). Ces mécanismes ont été particulièrement étudiés chez *S. aureus*, en raison de la capacité de cette espèce à se multiplier et à survivre *in vivo* où le fer est peu accessible.

La viande est un aliment riche en fer, mais comme dans la plupart des environnements, le fer est complexé à des protéines. Les principales sources de fer présentes dans la viande sont l'hémoglobine, la myoglobine, la transferrine et la ferritine.

La souche *S. xylosus* C2a se multiplie en présence d'hémoglobine. Sa croissance est plus faiblement et démarre seulement après un temps de latence prolongé en présence de myoglobine. Ceci indique que *S. xylosus* ne peut pas utiliser efficacement la myoglobine comme source de fer. Chez *S. aureus*, l'acquisition des sources de fer hémique est sous la dépendance du système Isd qui est un système complexe permettant la récupération de l'hème des hémoprotéines et son transfert en cascade de la paroi à la membrane de la bactérie (Hammer & Skaar, 2011). L'hème peut également être incorporé dans *S. aureus* via le système membranaire Hts (Skaar *et al.*, 2004b). De plus, *S. aureus* est capable de survivre en présence de fortes concentrations d'hème grâce au système d'efflux HtrAB sous la régulation du système à deux composantes HssSR ce qui lui permet de réguler les concentrations intracellulaires en hème (Friedman *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006). L'analyse du génome de *S. xylosus* a révélé qu'il possède uniquement une monooxygénase qui permet de dégrader l'hème en intracellulaire, le système de transport Hts et les systèmes de régulation Hss/Hrt. En l'absence de système permettant l'acquisition de l'hème à partir de l'hémoglobine, nous ne pouvons conclure sur le mécanisme mis en jeu par *S. xylosus*. Il faut noter que malgré la

présence du système Hss/Hrt, une inhibition de la croissance de *S. xylosus* est observée à la plus forte concentration en hémoglobine testée.

S. xylosus peut acquérir du fer via la transferrine. Chez *S. aureus*, cette acquisition est sous la dépendance des deux sidérophores de type carboxylate produits, la staphyloferrine A et la B ainsi que de leurs transporteurs respectifs Hts et Sir (Beasley *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2005). En présence d'un sidérophore exogène de type catéchol, le fer de la transferrine peut être transféré à ce sidérophore et ainsi être acquis par le transporteur Sst (Beasley *et al.*, 2011). L'analyse *in silico* du génome de *S. xylosus* a révélé qu'il possède le cluster de gènes *sfa/hts* qui codent des protéines intervenant dans la production de la staphyloferrine A et son acquisition et le cluster de gène *sst* qui intervient dans l'acquisition de sidérophores exogènes. Nous avons mis en évidence la production d'au moins un sidérophore chez *S. xylosus* qui pourrait correspondre à la production de la staphyloferrine A. Ce sidérophore pourrait être impliqué dans l'acquisition du fer de la transferrine chez *S. xylosus*.

Nous avons montré en comparant les vitesses maximales de croissance pour chacune des sources de fer que la ferritine était la source préférentielle de fer chez *S. xylosus* parmi les sources testées. De part les fortes quantités de fer stockées dans cette protéine, la ferritine pourrait être une source de fer privilégiée pour *S. xylosus* dans la viande. A notre connaissance, l'acquisition de fer à partir de ferritine n'a jamais été décrite chez les staphylocoques. Nous avons donc choisi de focaliser la suite de notre étude sur cette source de fer.

Quelques microorganismes ont développé différents mécanismes pour acquérir du fer à partir de la ferritine. *L. monocytogenes* peut acquérir du fer à partir de la ferritine via une réductase associée à la surface (Deneer *et al.*, 1995). *Burkholderia cenocepacia* adopte une stratégie de dégradation de type protéolytique (Whitby *et al.*, 2006). L'implication de sidérophores dans cette acquisition a été montrée chez certaines bactéries (Tidmarsh *et al.*, 1983). L'aérobactine et l'exochéline, deux sidérophores produits respectivement par *E. coli* et *Mycobacterium tuberculosis* jouent ce rôle (Brock *et al.*, 1991; Gobin & Horwitz, 1996). Récemment, il a été montré chez *B. cereus* que la bacilibactine est impliquée dans la prise en charge du fer de la ferritine (Segond *et al.*, 2014). Chez *B. cereus*, le fer de la ferritine n'est accessible qu'après une déstabilisation de la coque protéique par la protéine membranaire IlsA qui sert également de récepteur à la ferritine (Daou *et al.*, 2009; Segond *et al.*, 2014). Une autre stratégie utilisée par *Candida albicans* est basée sur la capture de la ferritine via l'adhésine Als3 et l'implication d'un complexe enzymatique membranaire composé d'une réductase, d'une

oxydase et d'une perméase pour le transport du fer à l'intérieur de la cellule (Almeida *et al.*, 2008). De plus, *C. albicans* provoque une acidification locale entraînant le relargage de fer de la ferritine (Almeida *et al.*, 2008).

Chez *S. xylosus*, nous avons montré qu'aucune protéase n'était impliquée et nous n'avons pas observé d'acidification en présence de ferritine. Comme nous l'avons vu, *S. xylosus* est capable de produire au moins un sidérophore. En présence de ferritine, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse (*sfaA*) et l'acquisition (*htsB*, *sstA*, *sstB*, *fhuC*) de sidérophore n'est pas modifiée, en référence à la source de fer FeSO_4 . Nous avons donc supposé que les sidérophores n'étaient pas impliqués dans l'acquisition du fer de la ferritine. Par ailleurs, nous avons observé une sous expression des gènes *sitABC* en présence de ferritine. Chez *S. aureus* et *S. epidermidis*, ces gènes codent un ABC transporteur qui est impliqué dans l'acquisition de cations métalliques (Cockayne *et al.*, 1998; Horsburgh *et al.*, 2002). Chez *S. xylosus*, ce système pourrait être impliqué dans l'acquisition de fer à partir du FeSO_4 . Enfin, nous avons observé une forte surexpression de trois gènes SXYL_00561/ SXYL_00562/SXYL_00563 organisés en opéron. Ils pourraient coder un complexe membranaire impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction. Nous avons réalisé une délétion dans le premier gène de l'opéron. Nous observons une augmentation de la phase de latence et une diminution de la vitesse maximale de croissance en présence de ferritine chez le mutant *S. xylosus* C2a Δ 561. Ceci montre que cette oxydo-réductase participe à l'acquisition du fer de la ferritine. Il n'y a pas de différence de croissance concernant la souche sauvage et la souche mutée en présence de FeSO_4 . *S. xylosus* n'acquiert donc pas du fer provenant du FeSO_4 de la même façon qu'il acquiert du fer provenant de la ferritine.

L'entrée de fer dans la cellule peut générer un stress oxydant via son interaction avec l' H_2O_2 générant ainsi des radicaux hydroxyles (OH^\cdot) (Gaupp *et al.*, 2012; Woodmansee & Imlay, 2002). Chez le mutant C2a Δ 561, nous montrons que les gènes *katB*, *katC* et *bsaA* codant des enzymes impliqués dans la détoxification de l' H_2O_2 sont sous exprimés en présence de ferritine par rapport à la souche sauvage. Nous pouvons supposer que de plus faibles quantités de fer entrent dans le mutant C2a Δ 561, ce qui diminuerait le stress oxydant.

Sur la base de ces premiers résultats de caractérisation, nous proposons un modèle d'utilisation du fer de la ferritine chez *S. xylosus* (Figure 40). Tout d'abord, la ferritine pourrait être reconnue par un récepteur à la surface de *S. xylosus*, comme cela a pu être démontré chez *B. cereus* et chez *C. albicans* (Almeida *et al.*, 2008; Daou *et al.*, 2009; Segond

et al., 2014). Pour l'instant, ni notre approche transcriptomique ni nos observations en microscopie n'ont permis de mettre en évidence un éventuel récepteur. La coque de la ferritine peut être déstabilisée soit par protéolyse, soit par acidification, soit par l'action directe du récepteur (Almeida *et al.*, 2008; Whitby *et al.*, 2006). Chez *S. xylosus*, nous n'avons pas identifié de mécanisme permettant de relarguer du fer de la ferritine. Cependant, notre approche par microscopie a permis de localiser la ferritine dans l'environnement cellulaire de *S. xylosus*, piégée dans l'exopolymère produit par la bactérie. Pour le moment, ne connaissant pas la nature de cet exopolymère, nous ne savons pas si ce polymère pourrait contribuer à la déstabilisation de la ferritine chez *S. xylosus*. Enfin, le fer libéré de la ferritine pourrait être pris en charge par le complexe d'oxydo-réduction que nous avons identifié et entrer dans la cellule.

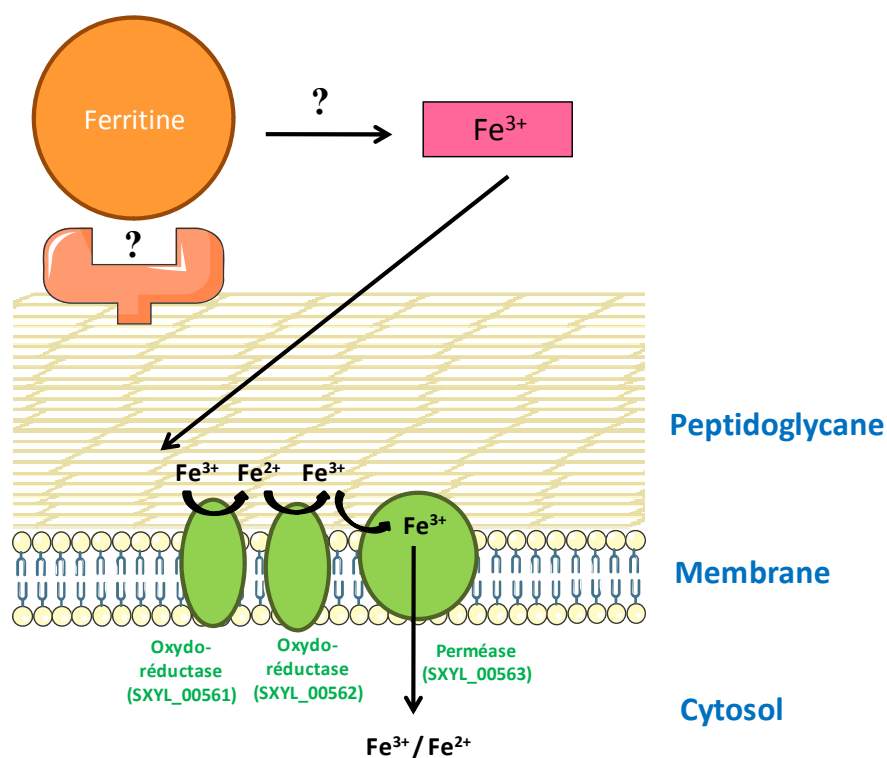


Figure 40: Représentation schématique du modèle de l'utilisation du fer de la ferritine chez *S. xylosus*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Staphylococcus xylosus est fréquemment isolé des produits carnés et d'environnements agroalimentaires. Il est de plus couramment utilisé comme ferment dans les produits carnés. *S. xylosus* intervient dans le développement des qualités organoleptiques assurant la typicité et la diversité des produits fermentés. La validation de l'annotation du génome de la souche *S. xylosus* C2a au cours de ma thèse a permis de mettre en place des approches transcriptomiques globales permettant de comprendre la façon dont *S. xylosus* s'adapte au modèle viande et à la présence de composés nitrosés fréquemment ajoutés dans les produits carnés. De plus, nous nous sommes intéressés à la ferritine, une protéine de stockage de fer très présente dans la viande et qui pourrait être une source de fer pour *S. xylosus*.

L'approche de transcriptomique globale a permis de mettre en évidence que 55% des gènes de *S. xylosus* sont différentiellement exprimés dans le modèle viande. La bactérie adapte son métabolisme à un milieu riche, la viande, en comparaison de l'inoculum cultivé en milieu minimum. *S. xylosus* surexprime des gènes codant des protéines qui catabolisent le glucose via le gluconate dans la voie des PP pour sa survie en phase stationnaire. Ce métabolisme est régulé par CcpA. *S. xylosus* surexprime des gènes codant des peptidases qui pourraient être une source d'acides aminés pour sa survie. En parallèle, il sous exprime de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés, probablement en raison de leur disponibilité dans la viande. Ces gènes sont majoritairement régulés par CodY qui est un répresseur global de la transcription des gènes impliqués dans l'utilisation de l'azote. *S. xylosus* surexprime fortement les gènes codant une glutamine synthase convertissant la glutamine en glutamate et la succinate semialdéhyde déshydrogénase qui mène à la formation de succinate. Le glutamate et la glutamine sont des métabolites clés servant de lien entre le métabolisme de l'azote et du carbone. Le glutamate est également un osmoprotectant des bactéries. Dans le modèle viande, *S. xylosus* doit s'adapter à un stress osmotique engendré par l'addition de sel dans la matrice. Il pourrait mettre en œuvre différents mécanismes d'accumulation et de synthèse d'osmoprotectants, d'excrétions de Na^+ . En complément l'ATP synthase pourrait contribuer à éliminer les protons et maintenir le pH intracellulaire.

Dans le modèle viande, *S. xylosus* répond à la présence de composés nitrosés en modulant 24 % de ses gènes. Les composés nitrosés génèrent un stress nitrosant et *S. xylosus* répond à ce stress par la surexpression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer via la dérégulation du régulateur Fur. *S. xylosus* surexprime aussi des gènes impliqués dans les mécanismes de protection et de détoxification, plus particulièrement codant des enzymes antioxydants via la

dérépression du régulateur PerR. Par ailleurs, *S. xylosus* surexprime des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et des protéines. Enfin, les espèces réactives de l'azote peuvent altérer les enzymes contenant des groupements soufrés, des centres métalliques ou des résidus tyrosine. *S. xylosus* doit s'adapter à ces changements en modulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des acides aminés.

Ces deux études transcriptomiques génèrent de nombreuses pistes de recherche. Il serait pertinent de réaliser des mutants de délétions sur les régulateurs CodY, CcpA, Fur ou PerR pour confirmer leur rôle dans l'adaptation de *S. xylosus* dans la viande ou sa réponse aux nitrates/nitrites et établir leur régulon. Le rôle de nombreux gènes reste à caractériser. Notamment, il serait intéressant d'étudier les deux gènes codant une glutamine synthase et la succinate semialdéhyde déshydrogénase qui sont co-localisés ce qui n'est pas habituellement décrit. Il pourrait également être intéressant de caractériser les trois nitroréductases que nous avons identifiées. En complément, le métabolome de *S. xylosus* dans le modèle viande pourrait être étudié par des approches chromatographiques liquide ou gazeuse couplées à de la spectrométrie de masse. Pour mieux caractériser la réponse de *S. xylosus* au stress nitrosant, il faudrait identifier les cibles protéiques oxydées par le NO par une approche globale de protéomique. Par ailleurs, ces deux études transcriptomiques ont été réalisées à partir de 24h d'incubation de *S. xylosus* dans le modèle viande, faute d'ARN de qualité satisfaisante aux temps d'incubation plus précoces. La réponse de la bactérie à des temps précoces pourrait être réalisée via une approche ciblée. Enfin, dans les produits carnés fermentés, il est d'usage d'ajouter un mélange de ferments comportant une bactérie lactique et un staphylocoque. Les interactions entre ces bactéries dans les produits carnés fermentés mériteraient d'être caractérisées.

Nous avons finalement montré au cours de ce travail que *S. xylosus* était capable d'acquérir du fer à partir de ferritine, de transferrine, et potentiellement d'hémoprotéines. La ferritine est une source de fer préférentielle pour *S. xylosus*. Nous avons identifié un opéron codant potentiellement un complexe membranaire impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction. Nous avons d'ores et déjà mis évidence l'implication de cet opéron dans l'acquisition du fer de la ferritine. Pour valider notre modèle, il faudra identifier le récepteur de la ferritine ou/et les mécanismes qui permettent la déstabilisation de la coque de la ferritine et donc le relargage de fer. Nous pourrions construire une banque de transposons chez *S. xylosus* et cribler cette banque vis-à-vis de la capacité de ces mutants à utiliser le fer de la ferritine. Nous

pourrions également rechercher des protéines cibles par un marquage des protéines avec des anticorps spécifiques de la ferritine. Enfin, il serait intéressant d'étudier les mécanismes d'acquisition des autres sources de fer présentes dans la viande et notamment la transferrine et l'hémoglobine. Il faudrait vérifier si le sidérophore de type staphyloferrine A produit par *S. xylosus*, ou potentiellement un autre sidérophore, est impliqué dans l'acquisition du fer de la transferrine ou si *S. xylosus* utilise un sidérophore exogène. Concernant l'acquisition de fer à partir de l'hémoglobine, le système Isd indispensable chez *S. aureus* pour cette acquisition n'est pas présent chez *S. xylosus*. Il reste donc à établir par quel mécanisme *S. xylosus* peut utiliser le fer hémique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aisen, P., Leibman, A. & Zweier, J. (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *The Journal of Biological Chemistry* 253, 1930-1937.
- Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Jr., Filler, S. G. & Hube, B. (2008). The Hyphal-Associated Adhesin and Invasin Als3 of *Candida albicans* Mediates Iron Acquisition from Host Ferritin. *PLOS Pathogens* 4, e1000217.
- Ambur, O. H., Davidsen, T., Frye, S. A., Balasingham, S. V., Lagesen, K., Rognes, T. & Tonjum, T. (2009). Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 453-470.
- Ando, M., Manabe, Y. C., Converse, P. J., Miyazaki, E., Harrison, R., Murphy, J. R. & Bishai, W. R. (2003). Characterization of the role of the divalent metal ion-dependent transcriptional repressor MntR in the virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 71, 2584-2590.
- Andrews, S. C. (1998). Iron storage in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 40, 281-351.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodríguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 215-237.
- Angelidis, A. S. & Smith, G. M. (2003). Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl Environ Microbiol* 69, 7492-7498.
- Anihouvi, V. B., Sakyi-Dawson, E., Ayernor, G. S. & Hounhouigan, J. D. (2007). Microbiological changes in naturally fermented cassava fish (*Pseudotolithus* sp.) for lanhouin production. *International Journal of Food Microbiology* 116, 287-291.
- Anzaldi, L. L. & Skaar, E. P. (2010). Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infection and Immunity* 78, 4977-4989.
- Arkoudelos, J. S. & Nychas, G. J. E. (1995). Comparative studies of the growth of *Staphylococcus carnosus* with or without glucose. *Letters in Applied Microbiology* 20, 19-24.
- Aro Aro, J. M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K.-i., Fukushima, M. & Sekikawa, M. (2010). The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry* 119, 279-285.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M. & Hugas, M. (2003). Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Appl Environ Microbiol* 69, 4583-4594.
- Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J. D. (2002). Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Molecular Microbiology* 45, 1613-1629.
- Barrière, C., Brückner, R. & Talon, R. (2001a). Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Appl Environ Microbiol* 67, 4096-4104.
- Barrière, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Setrin, S., Berdague, J. L. & Talon, R. (2001b). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* 201, 181-185.
- Barrière, C., Leroy-Sétrin, S. & Talon, R. (2001c). Characterization of catalase and superoxide dismutase in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *Journal of Applied Microbiology* 91, 514-519.

- Barrière, C., Brückner, R., Centeno, D. & Talon, R. (2002). Characterisation of the *katA* gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 216, 277-283.
- Bassias, J. & Brückner, R. (1998). Regulation of Lactose Utilization Genes in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology* 180, 2273-2279.
- Beasley, F. C., Vines, E. D., Grigg, J. C., Zheng, Q., Liu, S., Lajoie, G. A., Murphy, M. E. & Heinrichs, D. E. (2009). Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 72, 947-963.
- Beasley, F. C. & Heinrichs, D. E. (2010). Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104, 282-288.
- Beasley, F. C., Marolda, C. L., Cheung, J., Buac, S. & Heinrichs, D. E. (2011). *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by Staphyloferrin A, Staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence. *Infection and Immunity* 79, 2345-2355.
- Beck, H. C., Hansen, A. M. & Lauritsen, F. R. (2004). Catabolism of leucine to branched-chain fatty acids in *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1185-1193.
- Bender, R. A. (2012). Regulation of the histidine utilization (hut) system in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 565-584.
- Biswas, L., Biswas, R., Nerz, C. & other authors (2009). Role of the Twin-Arginine Translocation pathway in *Staphylococcus*. *Journal of Bacteriology* 191, 5921-5929.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. & Parente, E. (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 97, 271-284.
- Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Pepe, O. & Coppola, S. (2010). Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial *kat* (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *Journal of Clinical Microbiology* 48, 192-201.
- Blasco, F., Pommier, J., Augier, V., Chippaux, M. & Giordano, G. (1992). Involvement of the *narJ* or *narX* gene product in the formation of active nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6, 221-230.
- Breidt, F., Jr. & Stewart, G. C. (1987). Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Staphylococcus aureus* phospho-beta-galactosidase gene. *Appl Environ Microbiol* 53, 969-973.
- Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Fox, P. F., Goodfellow, M. & Cogan, T. M. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl Environ Microbiol* 68, 820-830.
- Brock, J. H., Williams, P. H., Licéaga, J. & Wooldridge, K. G. (1991). Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infection and Immunity* 59, 3185-3190.

- Brod, F. C., Pelisser, M. R., Bertoldo, J. B., Vernal, J., Bloch, C., Jr., Terenzi, H. & Arisi, A. C. (2010). Heterologous Expression and Purification of a Heat-Tolerant *Staphylococcus xylosus* Lipase. *Molecular Biotechnology* 44, 110-119.
- Brückner, R. & Rosenstein, R. (2006). Carbohydrate catabolism: pathways and regulation - Chapter 34. In *Gram-Positive Pathogens, 2nd Edition*, Eds Vincent A. Fischetti et al., pp.427-433.
- Bruckner, R., Wagner, E. & Gotz, F. (1993). Characterization of a sucrase gene from *Staphylococcus xylosus*. *Journal of Bacteriology* 175, 851-857.
- Brückner, R. & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters* 209, 141-148.
- Burke, K. A. & Lascelles, J. (1975). Nitrate reductase system in *Staphylococcus aureus* wild type and mutants. *Journal of Bacteriology* 123, 308-316.
- Burkhardt, R. & Braun, V. (1987). Nucleotide sequence of the *fhuC* and *fhuD* genes involved in iron (III) hydroxamate transport: domains in *FhuC* homologous to ATP-binding proteins. *Molecular Genetics and Genomics* 209, 49-55.
- Burne, R. A. & Chen, Y. Y. (2000). Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection* 2, 533-542.
- Carrondo, M. A. (2003). Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *The EMBO Journal* 22, 1959-1968.
- Casaburi, A., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. & Villani, F. (2005). Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science* 71, 643-650.
- Chaillou, S., Champomier-Verges, M. C., Cornet, M. & other authors (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23, 1527-1533.
- Champomier-Vergès, M.-C., Marceau, A., Méra, T. & Zagorec, M. (2002). The *pepR* gene of *Lactobacillus sakei* is positively regulated by anaerobiosis at the transcriptional level. *Appl Environ Microbiol* 68, 3873-3877.
- Chasco, J., Lizaso, G. & Beriain, M. J. (1996). Cured colour development during sausage processing. *Meat Science* 44, 203-211.
- Christiansen, I. & Hengstenberg, W. (1999). Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system--two highly similar glucose permeases in *Staphylococcus carnosus* with different glucoside specificity: protein engineering in vivo? *Microbiology* 145, 2881-2889.
- Clements, M. O., Watson, S. P. & Foster, S. J. (1999). Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 181, 3898-3903.
- Cockayne, A., Hill, P. J., Powell, N. B., Bishop, K., Sims, C. & Williams, P. (1998). Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermidis* ABC transporter. *Infection and Immunity* 66, 3767-3774.

- Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C. & Comi, G. (2001). A novel polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. *Meat Science* 58, 59-64.
- Coppola, R., Iorizzo, M., Saotta, R., Sorrentino, E. & Grazia, L. (1997). Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology* 14, 47-53.
- Coppola, S., Mauriello, G., Aponte, M., Moschetti, G. & Villani, F. (2000). Microbial succession during ripening of Naples-type salami, a southern Italian fermented sausage. *Meat Science* 56, 321-329.
- Corbiere Morot-Bizot, S., Leroy, S. & Talon, R. (2007). Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 102, 238-244.
- Coton, E., Desmonts, M.-H., Leroy, S., Coton, M., Jamet, E., Christeans, S., Donnio, P.-Y., Lebert, I. & Talon, R. (2010). Biodiversity of Coagulase-Negative Staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* 137, 221-229.
- Cretenet, M., Laroute, V., Ulve, V. & other authors (2011). Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Appl Environ Microbiol* 77, 247-257.
- D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J. M. & Michaud-Soret, I. (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 16619-16624.
- Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. & Heinrichs, D. E. (2004). Role of siderophore biosynthesis in virulence of *Staphylococcus aureus*: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infection and Immunity* 72, 29-37.
- Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierne, H., Kallassy, M., Lereclus, D. & Nielsen-LeRoux, C. (2009). IIsA, A Unique Surface Protein of *Bacillus cereus* Required for Iron Acquisition from Heme, Hemoglobin and Ferritin. *PLOS Pathogens* 5, e1000675.
- Darwin, A. & Stewart, V. (1996). The NAR modulon systems: nitrate and nitrite regulation of anaerobic gene expression. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*, pp. 343-359: Springer US.
- Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 317-364.
- Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.-C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S. & Le Borgne, F. o. (2004). Radioisotopic determination of l-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chemistry* 86, 137-142.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A. & other authors (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International* 33, 171-180.

- Drechsel, H., Freund, S., Nicholson, G., Haag, H., Jung, O., Zahner, H. & Jung, G. (1993). Purification and chemical characterization of staphyloferrin B, a hydrophilic siderophore from *staphylococci*. *Biometals* 6, 185-192.
- Dressaire, C., Redon, E., Milhem, H., Besse, P., Loubiere, P. & Coccagn-Bousquet, M. (2008). Growth rate regulated genes and their wide involvement in the *Lactococcus lactis* stress responses. *BMC Genomics* 9, 1471-2164.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F. & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 69, 307-317.
- Dubourdieu, M. & DeMoss, J. A. (1992). The *narJ* gene product is required for biogenesis of respiratory nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 174, 867-872.
- Eisermann, R., Fischer, R., Kessler, U., Neubauer, A. & Hengstenberg, W. (1991). Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Purification and protein sequencing of the *Staphylococcus carnosus* histidine-containing protein, and cloning and DNA sequencing of the *ptsH* gene. *European Journal of Biochemistry* 197, 9-14.
- Encyclopédie de la charcuterie (2004). In: Encyclopédie de la Charcuterie, Soussana 2^e ed., Alain Juillard & Jean Claude Frentz. France.
- Engelvin, G., Feron, G., Perrin, C., Molle, D. & Talon, R. (2000). Identification of beta-oxidation and thioesterase activities in *Staphylococcus carnosus* 833 strain. *FEMS Microbiology Letters* 190, 115-120.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & Lorenzo, V. D. (1999). Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *Journal of Bacteriology* 181, 6223-6229.
- Ezraty, B., Aussel, L. & Barras, F. d. r. (2005). Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1703, 221-229.
- Fadda, S., Lebert, A., Leroy-Setrin, S. & Talon, R. (2002). Decarboxylase activity involved in methyl ketone production by *Staphylococcus carnosus* 833, a strain used in sausage fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 210, 209-214.
- Fadda, S., Lopez, C. & Vignolo, G. (2010). Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science* 86, 66-79.
- Fast, B., Lindgren, P. & Götz, F. (1996). Cloning, sequencing, and characterization of a gene (*narT*) encoding a transport protein involved in dissimilatory nitrate reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Archives of Microbiology* 166, 361-367.
- Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B. & Götz, F. (2002). The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. *Journal of Bacteriology* 184, 6624-6634.
- Feehily, C. & Karatzas, K. A. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology* 114, 11-24.
- Fiegler, H. & Brückner, R. (1997). Identification of the serine acetyltransferase gene of *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiology Letters* 148, 181-187.

- Fiegler, H., Bassias, J., Jankovic, I. & Bruckner, R. (1999). Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein. *Journal of Bacteriology* 181, 4929-4936.
- Fillat, M. F. (2014). The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 546, 41-52.
- Fletcher, J. & Huehns, E. R. (1968). Function of Transferrin. *Nature* 218, 1211-1214.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sorensen, K., Hill, P., Msadek, T. & Ingmer, H. (2004). Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 54, 1445-1462.
- Friedman, D. B., Stauff, D. L., Pishchany, G., Whitwell, C. W., Torres, V. J. & Skaar, E. P. (2006). *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathog* 2, e87.
- Frolova, F., Kalb, A. J. & Yariv, J. (1994). Structure of a unique twofold symmetric haem-binding site. *Nature Structural & Molecular Biology* 1, 453-460.
- Fujita, Y., Fujita, T., Miwa, Y., Nihashi, J. & Aratani, Y. (1986). Organization and transcription of the gluconate operon, gnt, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 261, 13744-13753.
- Garcia-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I. & Rovira, J. (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology* 54, 189-195.
- Garcia-Varona Monica, S. E. M., Jaime Isabel, Rovira Jordi (2000). Characterisation of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology* 54, 189-195.
- Gat, O., Zaide, G., Inbar, I., Grosfeld, H., Chitlaru, T., Levy, H. & Shafferman, A. (2008). Characterization of *Bacillus anthracis* iron-regulated surface determinant (Isd) proteins containing NEAT domains. *Molecular Microbiology* 70, 983-999.
- Gaupp, R., Ledala, N. & Somerville, G. A. (2012). Staphylococcal response to oxidative stress. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.
- Gering, M., Gotz, F. & Bruckner, R. (1996). Sequence and analysis of the replication region of the *Staphylococcus xylosus* plasmid pSX267. *Gene* 182, 117-122.
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-Shapiro, D. B. & other authors (2005). *The emerging biology of the nitrite anion*: Nature Chemical Biology.
- Gobin, J. & Horwitz, M. A. (1996). Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *The Journal of Experimental Medicine* 183, 1527-1532.
- Götterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H. & Møller, J. K. S. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology* 120, 303-310.

- Gøtterup, J., Olsen, K., Knøchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H. & Møller, J. K. S. (2008). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Science* 78, 492-501.
- Grigg, J. C., Vermeiren, C. L., Heinrichs, D. E. & Murphy, M. E. (2007). Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain. *Molecular Microbiology* 63, 139-149.
- Gunka, K. & Commichau, F. M. (2012). Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Molecular Microbiology* 85, 213-224.
- Gutierrez-Preciado, A., Jensen, R. A., Yanofsky, C. & Merino, E. (2005). New insights into regulation of the tryptophan biosynthetic operon in Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* 21, 432-436.
- Haag, H., Fiedler, H. P., Meiwes, J., Drechsel, H., Jung, G. & Zahner, H. (1994). Isolation and biological characterization of staphyloferrin B, a compound with siderophore activity from *staphylococci*. *FEMS Microbiol Lett* 115, 125-130.
- Haley, K. P. & Skaar, E. P. (2012). A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes and Infection* 14, 217-227.
- Hammer, N. D. & Skaar, E. P. (2011). Molecular Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Iron Acquisition. In *Annual Review of Microbiology*, Vol 65, pp. 129-147. Edited by S. Gottesman & C. S. Harwood. Palo Alto: Annual Reviews.
- Hammes, W. P. (2011). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*.
- Hartmann, S., Wolf, G. & Hammes, W. P. (1995). Reduction of Nitrite by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus piscifermentans*. *Systematic and Applied Microbiology* 18, 323-328.
- Hassan, H. M. & Troxell, B. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3.
- He, Q., Huang, K. H., He, Z., Alm, E. J., Fields, M. W., Hazen, T. C., Arkin, A. P., Wall, J. D. & Zhou, J. (2006). Energetic consequences of nitrite stress in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, inferred from global transcriptional analysis. *Appl Environ Microbiol* 72, 4370-4381.
- Heinrichs, J. H., Gatlin, L. E., Kunsch, C., Choi, G. H. & Hanson, M. S. (1999). Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 181, 1436-1443.
- Hempel, K., Herbst, F. A., Moche, M., Hecker, M. & Becher, D. (2011). Quantitative proteomic view on secreted, cell surface-associated, and cytoplasmic proteins of the methicillin-resistant human pathogen *Staphylococcus aureus* under iron-limited conditions. *Journal of Proteome Research* 10, 1657-1666.
- Henkin, T. M. (1996). The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 135, 9-15.
- Hill, P. J., Cockayne, A., Landers, P., Morrissey, J. A., Sims, C. M. & Williams, P. (1998). SirR, a novel iron-dependent repressor in *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 66, 4123-4129.

- Hiramatsu, T., Kodama, K., Kuroda, T., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. (1998). A putative multisubunit Na⁺/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 180, 6642-6648.
- Hiron, A., Borezée-Durant, E., Piard, J.-C. & Juillard, V. (2007). Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 189, 5119-5129.
- Hochgräfe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S. & Hecker, M. (2008). Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 190, 4997-5008.
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C. & Jahn, D. (1995). The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiol Lett* 131, 219-225.
- Honikel, K.-O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 78, 68-76.
- Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E. & Foster, S. J. (2001a). PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 69, 3744-3754.
- Horsburgh, M. J., Ingham, E. & Foster, S. J. (2001b). In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *Journal of Bacteriology* 183, 468-475.
- Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Cox, A. G., Ingham, E., Peacock, S. & Foster, S. J. (2002). MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Molecular Microbiology* 44, 1269-1286.
- Huang, R. F., Yaong, H. C., Chen, S. C. & Lu, Y. F. (2004). In vitro folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *British Journal of Nutrition* 92, 887-894.
- Hufner, E., Markieton, T., Chaillou, S., Crutz-Le Coq, A. M., Zagorec, M. & Hertel, C. (2007). Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Appl Environ Microbiol* 73, 2522-2531.
- Hughes, M. C., Kerry, J. P., Arendt, E. K., Kenneally, P. M., McSweeney, P. L. & O'Neill, E. E. (2002). Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Science* 62, 205-216.
- Iacumin, L., Cocolin, L., Cantoni, C. & Comi, G. (2007). Preliminary analysis of the lipase gene (gehM) expression of *Staphylococcus xylosus* in vitro and during fermentation of naturally fermented sausages (*in situ*). *Journal of food protection* 70, 2665-2669.
- Igene, J. O., Yamauchi, K., Pearson, A. M., Gray, J. I. & Aust, S. D. (1985). Mechanisms by which nitrite inhibits the development of warmed-over flavour (WOF) in cured meat. *Food Chemistry* 18, 1-18.
- Ilbert, M., Horst, J., Ahrens, S., Winter, J., Graf, P. C., Lilie, H. & Jakob, U. (2007). The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 556-563.

- Irlinger, F., Morvan, A., El Solh, N. & Bergere, J. L. (1997). Taxonomic Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci in Ripening Flora from Traditional French Cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 319-328.
- Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 126, 302-310.
- Jang, S. & Imlay, J. A. (2007). Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 282, 929-937.
- Jankovic, I., Egeter, O. & Bruckner, R. (2001). Analysis of catabolite control protein A-dependent repression in *Staphylococcus xylosus* by a genomic reporter gene system. *Journal of Bacteriology* 183, 580-586.
- Jankovic, I. & Bruckner, R. (2007). Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosus*: catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 12, 114-120.
- Johansson, P., Paulin, L., Sade, E., Salovuori, N., Alatalo, E. R., Bjorkroth, K. J. & Auvinen, P. (2011). Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T, in association with specific spoilage reactions. *Appl Environ Microbiol* 77, 4344-4351.
- Johnson, M., Cockayne, A., Williams, P. H. & Morrissey, J. A. (2005). Iron-responsive regulation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* involves fur-dependent and fur-independent mechanisms. *Journal of Bacteriology* 187, 8211-8215.
- Jose, J., Schafer, U. K. & Kaltwasser, H. (1994). Threonine is present instead of cysteine at the active site of urease from *Staphylococcus xylosus*. *Archives of Microbiology* 161, 384-392.
- Kappes, R. M. & Bremer, E. (1998). Response of *Bacillus subtilis* to high osmolarity: uptake of carnitine, crotonobetaine and gamma-butyrobetaine via the ABC transport system OpuC. *Microbiology* 144, 83-90.
- Kenneally, P., Schwarz, G., Fransen, N. G. & Arendt, E. K. (1998). Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. *Journal of Food Science* 63, 538-543.
- Kiley, P. J. & Beinert, H. (1998). Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 341-352.
- Kleijn, R. J., van Winden, W. A., Ras, C., van Gulik, W. M., Schipper, D. & Heijnen, J. J. (2006). ¹³C-labeled gluconate tracing as a direct and accurate method for determining the pentose phosphate pathway split ratio in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* 72, 4743-4754.
- Kloos, W. E. & Schleifer, K. H. (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 25, 62-79.
- Kloos, W. E., Zimmerman, R. J. & Smith, R. F. (1976). Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol* 31, 53-59.

- Kloos, W. E. & Schleifer, K. H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 1013-1035. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins.
- Knezevic, I., Bachem, S., Sickmann, A., Meyer, H. E., Stulke, J. & Hengstenberg, W. (2000). Regulation of the glucose-specific phosphotransferase system (PTS) of *Staphylococcus carnosus* by the antiterminator protein GlcT. *Microbiology* 146, 2333-2342.
- Knobloch, J. K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H. & Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* 183, 2624-2633.
- Knobloch, J. K., Nedelmann, M., Kiel, K., Bartscht, K., Horstkotte, M. A., Dobinsky, S., Rohde, H. & Mack, D. (2003). Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants. *Appl Environ Microbiol* 69, 5812-5818.
- Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Meiwes, J. & Zahner, H. (1990). Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from *staphylococci*. *European Journal of Biochemistry* 191, 65-74.
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A. & Weiss, J. P. (2006). Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 188, 3622-3630.
- Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V. & other authors (1999). The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Molecular Microbiology* 31, 59-66.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. & other authors (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225-1240.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. & Hiramatsu, K. (2003). Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 49, 807-821.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H. & other authors (2005). Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 13272-13277.
- Lafarga, T. & Hayes, M. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 98, 227-239.
- Le Brun, N. E., Crow, A., Murphy, M. E. P., Mauk, A. G. & Moore, G. R. (2010). Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800, 732-744.
- Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2006). The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* 440, 363-367.
- Leroy, F., Verluyten, J. & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285.

- Leroy, S., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., Lebert, I. & Talon, R. (2010). Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiology* 27, 294-301.
- Linder, M. C., Nagel, G. M., Roboz, M. & Hungerford, D. M., Jr. (1981). The size and shape of heart and muscle ferritins analyzed by sedimentation, gel filtration, and electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry* 256, 9104-9110.
- Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V. & other authors (2007). Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 6, 17.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Cole, J. A. & Benjamin, N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology* 2, 593-602.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E. & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7, 156-167.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Ahluwalia, A. & other authors (2009). Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biologie* 5, 865-869.
- Lundberg, J. O., Carlstrom, M., Larsen, F. J. & Weitzberg, E. (2011). Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovascular Research*: 89, 525-532.
- Mah, J.-H. & Hwang, H.-J. (2009). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control* 20, 796-801.
- Majerczyk, C. D., Dunman, P. M., Luong, T. T., Lee, C. Y., Sadykov, M. R., Somerville, G. A., Bodi, K. & Sonenshein, A. L. (2010). Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 192, 2861-2877.
- Majernik, A., Gottschalk, G. & Daniel, R. (2001). Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring Na⁽⁺⁾(Li⁽⁺⁾)/H⁽⁺⁾ antiporter activity on *Escherichia coli*: characterization of the recovered genes and the corresponding gene products. *Journal of Bacteriology* 183, 6645-6653.
- Marraffini, L. A., DeDent, A. C. & Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-Positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 192-221.
- Martin, J. E. & Imlay, J. A. (2011). The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Molecular Microbiology* 80, 319-334.
- Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y. & Cohen, G. (2001). Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *Journal of Bacteriology* 183, 7260-7272.
- Masson, F., Hinrichsen, L., Talon, R. & Montel, M. C. (1999). Factors influencing leucine catabolism by a strain of *Staphylococcus carnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 49, 173-178.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science* 67, 149-158.

- Mayfield, J. E. & Duvall, M. R. (1996). *Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequences*: J Mol Evol. 1996 Apr;42(4):469-71.
- Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299, 906-909.
- Meiwes, J., Fiedler, H. P., Haag, H., Zähler, H., Konetschny-Rapp, S. & Jung, G. (1990). Isolation and characterization of staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS Microbiology Letters* 67, 201-206.
- Miethke, M. & Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71, 413-451.
- Miralles, M. C., Flores, J. & Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology* 13, 227-236.
- Moller, J. K., Hinrichsen, L. L. & Andersen, H. J. (1998). Formation of amino acid (L-leucine, L-phenylalanine) derived volatile flavour compounds by *Moraxella phenylpyruvica* and *Staphylococcus xylosus* in cured meat model systems. *International Journal of Food Microbiology* 42, 101-117.
- Moller, J. K. & Skibsted, L. H. (2002). Nitric oxide and myoglobins. *Chemical Reviews* 102, 1167-1178.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. & Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry* 59, 539-545.
- Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.-J., Holmgren, A. & Pueyo, C. (2001). Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli* : condition that trigger the transport level in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 276, 18031-18037.
- Montel, M. C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J. L. & Rousset-Akrim, S. (1996). Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology* 13, 489-499.
- Moos, T. & Morgan, E. H. (2000). Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cellular and Molecular Neurobiology* 20, 77-95.
- Morikawa, K., Ohniwa, R. L., Kim, J., Maruyama, A., Ohta, T. & Takeyasu, K. (2006). Bacterial nucleoid dynamics: oxidative stress response in *Staphylococcus aureus*. *Genes Cells* 11, 409-423.
- Morino, M., Suzuki, T., Ito, M. & Krulwich, T. A. (2014). Purification and functional reconstitution of a seven-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter. *Journal of Bacteriology* 196, 28-35.
- Morozkina, E. V. & Zvyagilskaya, R. A. (2007). Nitrate reductases: Structure, functions, and effect of stress factors. *Biochem-Moscow* 72, 1151-1160.
- Morrissey, J. A., Cockayne, A., Hill, P. J. & Williams, P. (2000). Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 68, 6281-6288.

- Morrissey, J. A., Cockayne, A., Brummell, K. & Williams, P. (2004). The Staphylococcal ferritins are differentially regulated in response to iron and manganese and via PerR and Fur. *Infection and Immunity* 72, 972-979.
- Morrissey, P. A., Sheehy, P. J., Galvin, K., Kerry, J. P. & Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science* 86, S73-86.
- Mosbah, H., Sayari, A., Mejdoub, H., Dhouib, H. & Gargouri, Y. (2005). Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1723, 282-291.
- Moskovitz, J. (2005). Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1703, 213-219.
- Mukhopadhyay, P., Zheng, M., Bedzyk, L. A., LaRossa, R. A. & Storz, G. (2004). Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 745-750.
- Mullner, M., Hammel, O., Mienert, B., Schlag, S., Bill, E. & Unden, G. (2008). A PAS domain with an oxygen labile [4Fe-4S](2+) cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*. *Biochemistry* 47, 13921-13932.
- Mumvihill, B. (2004). Micronutrients in meat. In *Encyclopedia of meat science* ed. Oxford: Elsevier, pp 618-623
- Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. & Kawano, J. (2002). Isolation and species distribution of *staphylococci* from animal and human skin. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 64, 245-250.
- Nakano, M. M. & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology* 52, 165-190.
- Neal, C. P., Freestone, P. P., Maggs, A. F., Haigh, R. D., Williams, P. H. & Lyte, M. (2001). Catecholamine inotropes as growth factors for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *staphylococci*. *FEMS Microbiology Letters* 194, 163-169.
- Neubauer, H. & Götz, F. (1996). Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology* 178, 2005-2009.
- Neubauer, H., Pantel, I. & Götz, F. (1999). Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology* 181, 1481-1488.
- Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 686-723.
- Nilkens, S., Koch-Singenstreu, M., Niemann, V., Gotz, F., Stehle, T. & Unden, G. (2014). Nitrate/oxygen co-sensing by an NreA/NreB sensor complex of *Staphylococcus carnosus*. *Molecular Microbiology* 91, 381-393.
- Nobre, L. S. & Saraiva, L. M. (2013). Effect of combined oxidative and nitrosative stresses on *Staphylococcus aureus* transcriptome. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 2563-2573.

- Nuxoll, A. S., Halouska, S. M., Sadykov, M. R., Hanke, M. L., Bayles, K. W., Kielian, T., Powers, R. & Fey, P. D. (2012). CcpA regulates arginine biosynthesis in *Staphylococcus aureus* through repression of proline catabolism. *PLOS Pathogens* 8, 29.
- Olesen, P. T., Meyer, A. S. & Stahnke, L. (2004a). Generation of flavour compounds in fermented sausages--the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science* 66, 675-687.
- Olesen, P. T., Stahnke, L. & Talon, R. (2004b). Effect of ascorbate, nitrate and nitrite on the amount of flavour compounds produced from leucine by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science* 68, 193-200.
- Oostindjer, M., Alexander, J., Amdam, G. V. & other authors (2014). The role of red and processed meat in colorectal cancer development: a perspective. *Meat Science* 97, 583-596.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M. & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39, 329-367.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M. & Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 30, 67-88.
- Pantel, I., Lindgren, P. E., Neubauer, H. & Götz, F. (1998). Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon. *Molecular and General Genetics* 259, 105-114.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* 65, 859-867.
- Park, R. Y., Choi, M. H., Sun, H. Y. & Shin, S. H. (2005). Production of catechol-siderophore and utilization of transferrin-bound iron in *Bacillus cereus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1132-1135.
- Passerini, D., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Fontagné-Faucher, C., Daveran-Mingot, M.-L. & Coccagn-Bousquet, M. (2013). The Carbohydrate Metabolism Signature of *Lactococcus lactis* Strain A12 Reveals Its Sourdough Ecosystem Origin. *Appl Environ Microbiol* 79, 5844-5852.
- Pedersen, M. B., Garrigues, C., Tophile, K., Brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., Mollgaard, H., Gaudu, P. & Gruss, A. (2008). Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon. *Journal of Bacteriology* 190, 4903-4911.
- Pellerin, J.L., Gautier, M. & Leloir, Y. (2010). Taxonomie et habitat – Chapter 1. In *Staphylococcus aureus*, Eds Tec&Doc, pp 11-64
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G. & Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 8405-8410.
- Planchon, S., Chambon, C., Desvaux, M., Chafsey, I., Leroy, S., Talon, R. & Hébraud, M. (2007). Proteomic analysis of cell envelope from *Staphylococcus xylosus* C2a, a coagulase-negative *Staphylococcus*. *Journal of Proteome Research* 6, 3566-3580.

- Planchon, S., Desvaux, M., Chafsey, I., Chambon, C., Leroy, S., Hébraud, M. & Talon, R. (2009). Comparative subproteome analyses of planktonic and sessile *Staphylococcus xylosus* C2a: New insight in cell physiology of a coagulase-negative *Staphylococcus* in biofilm. *Journal of Proteome Research* 8, 1797-1809.
- Poolman, B., Knol, J., van der Does, C., Henderson, P. J., Liang, W. J., Leblanc, G., Pourcher, T. & Mus-Veteau, I. (1996). Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Molecular Microbiology* 19, 911-922.
- Pragai, Z., Eschevins, C., Bron, S. & Harwood, C. R. (2001). *Bacillus subtilis* NhaC, an Na⁺/H⁺ antiporter, influences expression of the phoPR operon and production of alkaline phosphatases. *Journal of Bacteriology* 183, 2505-2515.
- Pretorius, B., Schonfeldt, H., Hall, N. Relative bioavailability of iron of south African lean meat (beef, lamb, pork and chicken). SAAFoST Congress, Afrique du Sud Octobre 2013
- Que, Q. & Helmann, J. D. (2000). Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Molecular Microbiology* 35, 1454-1468.
- Rabinovitch, I., Yanku, M., Yeheskel, A., Cohen, G., Borovok, I. & Aharonowitz, Y. (2010). *Staphylococcus aureus* NrdH Redoxin Is a Reductant of the Class Ib Ribonucleotide Reductase. *Journal of Bacteriology* 192, 4963-4972.
- Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G. & Cocolin, L. (2005). Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *International Journal of Food Microbiology* 97, 277-284.
- Ravyts, F., Vrancken, G., D'Hondt, K., Vasilopoulos, C., De Vuyst, L. & Leroy, F. (2009). Kinetics of growth and 3-methyl-1-butanol production by meat-borne, coagulase-negative staphylococci in view of sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 134, 89-95.
- Reizer, J., Bergstedt, U., Galinier, A., Kuster, E., Saier, M. H., Jr., Hillen, W., Steinmetz, M. & Deutscher, J. (1996). Catabolite repression resistance of gnt operon expression in *Bacillus subtilis* conferred by mutation of His-15, the site of phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of the phosphocarrier protein HPr. *Journal of Bacteriology* 178, 5480-5486.
- Reniere, M. L. & Skaar, E. P. (2008). *Staphylococcus aureus* haem oxygenases are differentially regulated by iron and haem. *Molecular Microbiology* 69, 1304-1315.
- Reniere, M. L., Ukpabi, G. N., Harry, S. R., Stec, D. F., Krull, R., Wright, D. W., Bachmann, B. O., Murphy, M. E. & Skaar, E. P. (2010). The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Molecular Microbiology* 75, 1529-1538.
- Richardson, A. R., Dunman, P. M. & Fang, F. C. (2006). The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Molecular Microbiology* 61, 927-939.
- Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R. & Dringen, R. (2004). Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Anal Biochem* 331, 370-375.
- Rosenstein, R., Futter-Bryniok, D. & Gotz, F. (1999). The choline-converting pathway in *Staphylococcus xylosus* C2A: genetic and physiological characterization. *Journal of Bacteriology* 181, 2273-2278.

- Rosenstein, R., Nerz, C., Biswas, L., Resch, A., Raddatz, G., Schuster, S. C. & Gotz, F. (2009). Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl Environ Microbiol* 75, 811-822.
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S. & Suzzi, G. (2001). Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosus* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology* 90, 365-371.
- Rossi, M., Amaretti, A. & Raimondi, S. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 3, 118-134.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S. & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology* 53, 303-317.
- Saier, M. H., Jr., Chauvaux, S., Cook, G. M., Deutscher, J., Paulsen, I. T., Reizer, J. & Ye, J. J. (1996). Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology* 142, 217-230.
- Sakinc, T., Woznowski, M., Ebsen, M. & Gatermann, S. G. (2005). The surface-associated protein of *Staphylococcus saprophyticus* is a lipase. *Infection and Immunity* 73, 6419-6428.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M. & Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami -- a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44, 69-82.
- Saum, S. H., Sydow, J. F., Palm, P., Pfeiffer, F., Oesterheld, D. & Muller, V. (2006). Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *Journal of Bacteriology* 188, 6808-6815.
- Schlag, S., Fuchs, S., Nerz, C., Gaupp, R., Engelmann, S., Liebeke, M., Lalk, M., Hecker, M. & Gotz, F. (2008). Characterization of the oxygen-responsive NreABC regulon of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 190, 7847-7858.
- Schneewind, O. & Missiakas, D. (2014). Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 196, 1133-1142.
- Schneider, R. & Hantke, K. (1993). Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding protein-dependent transport system. *Molecular Microbiology* 8, 111-121.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical-assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160, 47-56.
- Sebranek, J. G. & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* 77, 136-147.
- Sebulsky, M. T., Hohnstein, D., Hunter, M. D. & Heinrichs, D. E. (2000). Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 182, 4394-4400.
- Sebulsky, M. T. & Heinrichs, D. E. (2001). Identification and characterization of fhuD1 and fhuD2, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 183, 4994-5000.

- Segond, D., Abi Khalil, E., Buisson, C., Daou, N., Kallassy, M., Lereclus, D., Arosio, P., Bou-Abdallah, F. & Nielsen Le Roux, C. (2014). Iron acquisition in *Bacillus cereus*: the roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. *PLoS Pathogens* 10, e1003935.
- Shadbolt, C., Ross, T. & McMeekin, T. A. (2001). Differentiation of the effects of lethal pH and water activity: food safety implications. *Letters in Applied Microbiology* 32, 99-102.
- Sheldon, J. & Heinrichs, D. (2012). The iron-regulated staphylococcal lipoproteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.
- Shivers, R. P. & Sonenshein, A. L. (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Molecular Microbiology* 53, 599-611.
- Siezen, R. J., Starrenburg, M. J. C., Boekhorst, J., Renckens, B., Molenaar, D. & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Appl Environ Microbiol* 74, 424-436.
- Silvanose, C. D., Bailey, T. A., Naldo, J. L. & Howlett, J. C. (2001). Bacterial flora of the conjunctiva and nasal cavity in normal and diseased captive bustards. *Avian Diseases* 45, 447-451.
- Singh, V. K. & Moskovitz, J. (2003). Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology* 149, 2739-2747.
- Skaar, E. P., Gaspar, A. H. & Schneewind, O. (2004a). IsdG and IsdI, Heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 436-443.
- Skaar, E. P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K. L. & Schneewind, O. (2004b). Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* 305, 1626-1628.
- Skaar, E. P. & Schneewind, O. (2004). Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes and Infection* 6, 390-397.
- Slaughter, D. M., Patton, T. G., Sievert, G., Sobieski, R. J. & Crupper, S. S. (2001). Antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from Cope's gray treefrogs (*Hyla chrysoscelis*). *FEMS Microbiol Letter* 205, 265-270.
- Smith, A., Rowan, R., McCann, M. & Kavanagh, K. (2012). Exposure of *Staphylococcus aureus* to silver(I) induces a short term protective response. *Biometals* 25, 611-616.
- Smith, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics Molecular Biology* 3, Article3. Epub 2004 Feb 2012.
- Solheim, M., La Rosa, S. L., Mathisen, T., Snipen, L. G., Nes, I. F. & Brede, D. A. (2014). Transcriptomic and Functional Analysis of NaCl-Induced Stress in *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 9, e94571.
- Spencer, J. B., Stolowich, N. J., Roessner, C. A. & Scott, A. I. (1993). The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS Letters* 335, 57-60.

- Spiro, S. (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 193-211.
- Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels -- Part II. Volatile components. *Meat Science* 41, 193-209.
- Stahnke, L. H. (1999). Volatiles Produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during Growth in Sausage Minces Part II. The Influence of Growth Parameters. *LWT - Food Science and Technology* 32, 365-371.
- Stauff, D. L., Torres, V. J. & Skaar, E. P. (2007). Signaling and DNA-binding Activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS Two-component System Required for Heme Sensing. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26111-26121.
- Stojiljkovic, I. & Hantke, K. (1995). Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Molecular Genetics and Genomics* 247, 199-205.
- Streker, K., Freiberg, C., Labischinski, H., Hacker, J. & Ohlsen, K. (2005). *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. *Journal of Bacteriology* 187, 2249-2256.
- Sun, D. & Setlow, P. (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* ansR gene, which encodes a repressor of the ans operon coding for L-asparaginase and L-aspartase. *Journal of Bacteriology* 175, 2501-2506.
- Swartz, T. H., Ito, M., Ohira, T., Natsui, S., Hicks, D. B. & Krulwich, T. A. (2007). Catalytic properties of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* members of the secondary cation/proton antiporter-3 (Mrp) family are revealed by an optimized assay in an *Escherichia coli* host. *Journal of Bacteriology* 189, 3081-3090.
- Talon, R., Rouchon, P., Denoyer, C., Montel, M. C. & Berdagué, J. L. (1995). Production of esters by immobilized lipase of *Staphylococcus warneri*. In *Bioflavour 95*, pp. 365-368. Dijon, France: Les Colloques n°75, INRA, Paris.
- Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barrière, C. & Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 52, 47-56.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. & Fadda, S. (2002). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products - Chapter 10. In *Research Advances in Quality of Meat and Meat Products*, pp. 175-191. Edited by F. Toldrá: Research Signpost.
- Talon, R. & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science* 89, 303-309.
- Tavares, A. F. N., Nobre, L. S., Melo, A. M. P. & Saraiva, L. M. (2009). A Novel Nitroreductase of *Staphylococcus aureus* with S-Nitrosoglutathione Reductase Activity. *Journal of Bacteriology* 191, 3403-3406.
- Thompson, B. J., Widdick, D. A., Hicks, M. G., Chandra, G., Sutcliffe, I. C., Palmer, T. & Hutchings, M. I. (2010). Investigating lipoprotein biogenesis and function in the model Gram-positive bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 21, 21.

- Throup, J. P., Zappacosta, F., Lunsford, R. D. & other authors (2001). The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* 40, 10392-10401.
- Tidmarsh, G. F., Klebba, P. E. & Rosenberg, L. T. (1983). Rapid release of iron from ferritin by siderophores. *Journal of Inorganic Biochemistry* 18, 161-168.
- Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L. & Martinussen, J. (2004). The pH-unrelated influence of salt, temperature and manganese on aroma formation by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* in a fermented meat model system. *International Journal of Food Microbiology* 97, 31-42.
- Torres, V. J., Pishchany, G., Humayun, M., Schneewind, O. & Skaar, E. P. (2006). *Staphylococcus aureus* IsdB Is a Hemoglobin Receptor Required for Heme Iron Utilization. *Journal of Bacteriology* 188, 8421-8429.
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 1-6.
- Turroni, F., Strati, F., Foroni, E., Serafini, F., Duranti, S., van Sinderen, D. & Ventura, M. (2012). Analysis of predicted carbohydrate transport systems encoded by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Appl Environ Microbiol* 78, 5002-5012.
- Valderas, M. W., Gatson, J. W., Wreyford, N. & Hart, M. E. (2002). The superoxide dismutase gene *sodM* is unique to *Staphylococcus aureus*: absence of *sodM* in coagulase-negative staphylococci. *Journal of Bacteriology* 184, 2465-2472.
- van Oort, M. G., Deveer, A. M., Dijkman, R., Tjeenk, M. L., Verheij, H. M., de Haas, G. H., Wenzig, E. & Gotz, F. (1989). Purification and substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *Biochemistry* 28, 9278-9285.
- von Ossowski, I., Hausner, G. & Loewen, P. C. (1993). Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *Journal of Molecular Evolution* 37, 71-76.
- Wallace, S. S. (1988). Ap endonucleases and dna glycosylases that recognize oxidative dna damage. *Environmental Mutagenesis* 12, 431-477.
- Walter P, H. (2011). Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: From Siderophores to Hemophores. *Annual Review of Microbiology* 58, 611-647.
- Whitby, P. W., VanWagoner, T. M., Springer, J. M., Morton, D. J., Seale, T. W. & Stull, T. L. (2006). *Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source. *Journal of Medical Microbiology* 55, 661-668.
- Wolf, C., Hochgrafe, F., Kusch, H., Albrecht, D., Hecker, M. & Engelmann, S. (2008). Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: diverse responses to different oxidants. *Proteomics* 8, 3139-3153.
- Woodmansee, A. N. & Imlay, J. A. (2002). Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *Journal of Biological Chemistry* 277, 34055-34066.

- Woodson, K. & Devine, K. M. (1994). Analysis of a ribose transport operon from *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140, 1829-1838.
- Wu, R., Skaar, E. P., Zhang, R., Joachimiak, G., Gornicki, P., Schneewind, O. & Joachimiak, A. (2005). *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *Journal of Biological Chemistry* 280, 2840-2846.
- Yamada, K., Sanzen, I., Ohkura, T., Okamoto, A., Torii, K., Hasegawa, T. & Ohta, M. (2007). Analysis of twin-arginine translocation pathway homologue in *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 55, 14-19.
- Yoshida, K., Ohmori, H., Miwa, Y. & Fujita, Y. (1995). *Bacillus subtilis* gnt repressor mutants that diminish gluconate-binding ability. *Journal of Bacteriology* 177, 4813-4816.
- Zapotoczna, M., Heilbronner, S., Speziale, P. & Foster, T. J. (2012). Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of Bacteriology* 194, 6453-6467.
- Zhang, Y. Q., Ren, S. X., Li, H. L. & other authors (2003). Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Molecular Microbiology* 49, 1577-1593.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Chapitre d'ouvrage

Leroy S., Vermassen A., Talon R. 2015. *Staphylococcus*: Occurrence and Properties. In: *Encyclopedia of Food and Health*, Ed. Taylor J., Elsevier Limited Publisher. Chapter 656.

Communications orales

Vermassen A., Talon R., Leroy S. How nitrate and nitrite influenced iron homeostasis in *Staphylococcus xylosus* in fermented meat? FoodMicro, 24th International ICFMH Conférence, Nantes, septembre 2014. Communication orale A. Vermassen et résumé.

Vermassen A., Talon R., Gaillard-Martinie B., Leroy S. La ferritine, une source de fer pour le ferment carné *Staphylococcus xylosus* ? 2ème Journée des Microscopistes clermontois, Clermont-Ferrand, France, octobre 2013. Communication orale A. Vermassen et résumé.

Vermassen A., Micheau P., Chacornac J.P., de La Foye A., Talon R., Leroy S. Quelle réponse de *Staphylococcus xylosus* aux composés nitrosés : un lien avec le fer ? 10ème Journée des Microbiologistes d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, avril 2013. Communication orale A. Vermassen et résumé.

Vermassen A., Micheau P., Chacornac J.P., de La Foye A., Talon R., Leroy S. Impact des composés nitrosés sur *Staphylococcus xylosus* en matrice carnée. IXème Congrès de la SFM, Lille, février 2013. Communication orale A. Vermassen et résumé.

Communications affichées

Vermassen A., Micheau P., Chacornac J.P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Leroy S. Ferritin, a preferential iron meat source for *Staphylococcus xylosus*? FoodMicro, 24th International ICFMH Conférence, Nantes, septembre 2014. Communication affichée et résumé.

Vermassen A., Leroy S., de La Foye A., Chacornac J.P., Micheau P., Talon R. Global transcriptome response of the starter culture *Staphylococcus xylosus* in meat. FoodMicro, 24th International ICFMH Conférence, Nantes, septembre 2014. Communication affichée et résumé

Velebit B., Leroy S., Talon R., Jankovic V., Vermassen A. Staphylococcal enterotoxin A gene expression in sliced ham under modified atmosphere packaging. FoodMicro, 24th International ICFMH Conférence, Nantes, septembre 2014. Communication affichée et résumé.

Vermassen A., Micheau P., Chacornac J.P., Talon R., Leroy S. Transcriptomic response of *Staphylococcus xylosus* to nitrate-nitrite in meat model. FoodMicro, 23rd International ICFMH Symposium, Istanbul, Turkey, septembre 2012. Communication affichée et résumé.

Vermassen A., Leroy S., Talon R. Iron acquisition in *Staphylococcus xylosus*, a meat starter culture. 8th International Biometals Symposium, Brussels, Belgium, Juillet 2012. Communication affichée et résumé.

Vermassen A., Micheau P., Chacornac J.P., Talon R., Leroy S. Réponse adaptative de *Staphylococcus xylosus* aux composés nitrosés. Journées de l'école doctorale des Sciences de la vie, Clermont Ferrand, Mai 2012. Communication affichée et résumé

Communications orales

How nitrate and nitrite influenced iron homeostasis in *Staphylococcus xylosus* in fermented meat?

VERMASSEN Aurore, TALON Régine, LEROY Sabine

INRA, UR 454 Microbiologie, 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Staphylococcus xylosus is commonly used as starter culture in meat fermentation. In fermented meat products, nitrate and nitrite are used as additives for their bacteriostatic and sensory properties. *S. xylosus* via its nitrate reductase activity reduced nitrate to nitrite and then nitrite is reduced in nitric oxide (NO) which interacted with myoglobin to form nitrosomyoglobin responsible of the red stable color. The current context aims at limiting nitrate and nitrite in food but the impact of these additives on the physiology of starter cultures in meat is unknown. The global expression of *S. xylosus in situ* in a meat model in presence of nitrate and nitrite, investigated by a transcriptomic approach, revealed that more than 600 genes of *S. xylosus* were differentially expressed. An original response of *S. xylosus* to the presence of these compounds was highlighted: up-regulation of 17 genes involved in iron acquisition. Most of these genes were related to the production or harnessing of siderophores (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*). The chrome azurol S assay confirmed that *S. xylosus* produced at least one siderophore. An *in silico* analysis revealed that these genes possess a putative Fur box revealing that these iron acquisition and transport systems can be regulated in part by Fur (Ferric uptake regulator), a transcriptional repressor responsible for iron homeostasis. Our hypothesis is that NO from nitrite can inactivate Fur thus derepressing the regulon and consequently genes involved in iron intake were up regulated in *S. xylosus*. To support this hypothesis, genes involved in oxidative stress resistance mechanisms were up expressed (*kat*, *ahp*, *trxB*, *ftn*). This study highlighted ability of *S. xylosus* to mitigate nitrosative stress generated by addition of nitrate and nitrite and necessity to understand the physiology of starter cultures *in situ* in meat matrix to better adjust the concentration of these additives.

24^{ème} congrès FoodMicro

septembre 2014 Nantes, France

**LA FERRITINE, UNE SOURCE DE FER POUR LE FERMENT CARNE
STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS ?**

Vermassen A., Talon R., Gaillard-Martinie B., Leroy S.

INRA, UR 454 Microbiologie
63122 Saint-Genès Champanelle

Staphylococcus xylosus est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses des animaux. Cette espèce est donc tout naturellement isolée des aliments d'origine animale. *S. xylosus* appartient au groupe des staphylocoques à coagulase négative et est historiquement défini comme une bactérie non pathogène. Cette espèce est couramment utilisée comme ferment dans les produits carnés pour son rôle dans le développement de la couleur et de la saveur. L'analyse du génome de *S. xylosus* a révélé la présence de nombreux gènes codant des protéines impliquées dans le transport et l'acquisition du fer qui pourraient expliquer sa croissance dans la viande, un aliment riche en fer hémique et non hémique. Pour comprendre le rôle du fer dans la physiologie de la souche *S. xylosus* C2a, nous avons étudié sa croissance dans un milieu chimiquement défini supplémenté ou non avec du FeSO₄ ou les différentes sources de fer présentes dans la viande : la ferritine, la transferrine, la myoglobine, ou l'hémoglobine. Sa croissance varie selon les différentes sources de fer et *S. xylosus* n'a pas la capacité à utiliser le fer hémique. La source préférentielle de *S. xylosus* est la ferritine. L'étude transcriptomique de cette souche en présence de ferritine ou de FeSO₄ a montré la surexpression de deux opérons potentiellement impliqués dans l'acquisition de la ferritine. Une approche de marquage immunologique à l'or et visualisation en microscopie électronique à transmission nous a permis de localiser la ferritine dans l'environnement cellulaire de la souche *S. xylosus* C2a. Il s'agit de la première étude mettant en évidence le comportement de *S. xylosus* vis-à-vis des différentes sources de fer présentes dans la viande et montrant l'utilisation de la ferritine chez un staphylocoque.

2^{ème} journée des microscopistes clermontois

octobre 2013 Clermont-Ferrand, France

Quelle réponse de *Staphylococcus xylosus* aux composés nitrosés : un lien avec le fer ?

VERMASSEN Aurore⁽¹⁾, MICHEAU Pierre⁽¹⁾, DE LA FOYE Anne⁽²⁾,
CHACORNAC Jean-Paul⁽¹⁾, TALON Régine⁽¹⁾, LEROY Sabine⁽¹⁾

INRA, UR 454 Microbiologie⁽¹⁾, Plateforme d'Exploration du Métabolisme⁽²⁾
63122 Saint-Genès Champanelle

Staphylococcus xylosus est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses des animaux et se retrouve naturellement présente dans de nombreux aliments d'origine animale. Cette espèce est couramment utilisée comme ferment dans les produits carnés pour son rôle dans le développement de la couleur et de la flaveur. Dans les produits carnés transformés, il est d'usage de rajouter du nitrate mais également du nitrite comme additifs pour leurs effets bactériostatiques et sensoriels. Le contexte actuel vise à limiter l'utilisation de composés nitrosés. Cependant, la réponse des ferments à ces additifs est totalement méconnue. Notre objectif a été de caractériser l'expression de *S. xylosus in situ* en matrice carnée en présence de composés nitrosés. Cette expression a été étudiée par une approche de transcriptomique globale via l'utilisation d'une puce à ADN spécifique de cette espèce puis validée par RT-PCR quantitative. L'analyse statistique des résultats obtenus par l'approche de transcriptomique globale fait apparaître plus de 600 gènes de *S. xylosus* dont l'expression est significativement différente en matrice carnée à 24 et/ou 72h d'incubation en présence de nitrate et de nitrite. Les gènes ont été classés en catégories fonctionnelles. Les catégories les plus représentées sont : les processus et stockage de l'information génétique, les processus cellulaires, le métabolisme, les phages et les fonctions inconnues ou mal caractérisées. Des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (*kat*, *ahp*, *gpx*) et dans les mécanismes d'acquisition du fer dans la cellule via des sidérophores (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*) ont leur expression modifiée. Au vu de la diversité des sources de fer présentes dans la viande (ferritine, myoglobine, hémoglobine, transferrine) et de l'impact des composés nitrosés sur les systèmes de captation et de transport du fer, une analyse approfondie du génome de *S. xylosus* a été réalisée confirmant la présence de nombreux gènes en lien avec cet élément. Les résultats de cette étude sont les premiers caractérisant le comportement de *S. xylosus in situ* en matrice carnée en présence de composés nitrosés. Ils indiquent un changement global de l'expression des gènes de *S. xylosus* dans ces conditions.

10^{ème} journée des microbiologistes d'Auvergne

avril 2013 Clermont-Ferrand, France

Impact des composés nitrosés sur *Staphylococcus xylosus* en matrice carnée

Aurore Vermassen¹, Pierre Micheau¹, Anne de La Foye², Jean-Paul Chacornac¹, Régine Talon¹, Sabine Leroy¹

¹ INRA, UR 454 Microbiologie

² INRA, Plateforme d'Exploration du Métabolisme

Centre de Clermont Ferrand - Theix

63122 Saint-Genès Champanelle

Staphylococcus xylosus est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses des animaux et se retrouve naturellement présente dans de nombreux aliments d'origine animale. Cette espèce est couramment utilisée comme ferment dans les produits carnés pour son rôle dans le développement de la couleur et de la flaveur. Dans les produits carnés transformés, il est d'usage de rajouter du nitrate mais également du nitrite comme additifs pour leurs effets bactériostatiques et sensoriels. Le contexte actuel vise à limiter l'utilisation de composés nitrosés. Cependant, la réponse des ferments à ces additifs est totalement méconnue.

Notre objectif a été de caractériser l'expression de *S. xylosus in situ* en matrice carnée en présence de composés nitrosés.

Cette expression a été étudiée par une approche de transcriptomique globale via l'utilisation d'une puce à ADN spécifique de cette espèce ainsi que par une approche ciblée sur des gènes d'intérêt. Les ARN totaux de *S. xylosus* ont été extraits des matrices de viande à 24 et 72h d'incubation puis rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc). Les ADNc ont été marqués par des fluorophores (cyanine 3 ou 5) puis hybridés sur puce à ADN selon les recommandations du fournisseur (Agilent).

L'analyse statistique des résultats obtenus par l'approche de transcriptomique globale fait apparaître plus de 600 gènes de *S. xylosus* dont l'expression est significativement différente en matrice carnée à 24 et/ou 72h d'incubation en présence de nitrate et de nitrite. Les gènes ont été classés en catégories fonctionnelles. Les catégories les plus représentées sont : les processus et stockage de l'information génétique, les processus cellulaires, le métabolisme, les phages et les fonctions inconnues ou mal caractérisées. Parmi ceux-ci, des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (*kat*, *ahp*, *gpx*), dans les mécanismes d'acquisition du fer dans la cellule (*sfa*, *hts*, *fhu*, *sst*) et dans la biosynthèse des acides aminés ramifiés (*leu*, *ilv*) ont leur expression modifiée. Les gènes impliqués dans la réduction du nitrate (*nar*) et du nitrite (*nir*) sont peu ou pas différentiellement exprimés. Les résultats des expériences de puces à ADN ont été validés par RT-PCR quantitative.

Les résultats de cette étude sont les premiers caractérisant le comportement de *S. xylosus in situ* en matrice carnée en présence de composés nitrosés. Ils indiquent un changement global de l'expression des gènes de *S. xylosus* dans ces conditions.

9^{ème} congrès de la SFM

février 2013 Lille, France

24^{ème} congrès FoodMicro
septembre 2014 Nantes, France



Conclusion

This study is the first characterization of the adaptation of the starter culture *S. xylosum* in meat. It revealed a global change in the gene expression of this bacterium in this environment. Among the genes modulated in meat, the ones involved in the metabolism of gluconate, glutamate and nucleotides were highly up-expressed. Presence of NaCl induced the up-expression of 8 genes implicated in the osmoprotection. The study increases the understanding of how *S. xylosum* can grow and survive in meat.

Global transcriptome response of the starter culture *Staphylococcus xylosum* in meat model

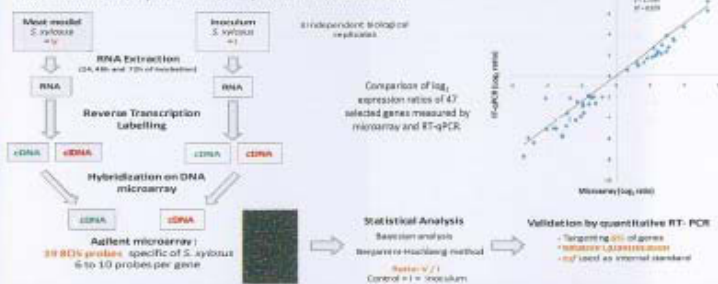


Introduction

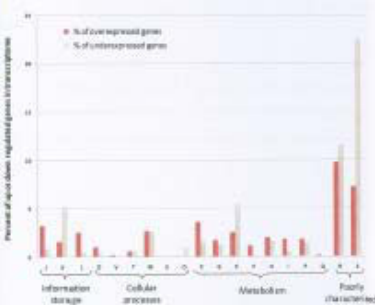
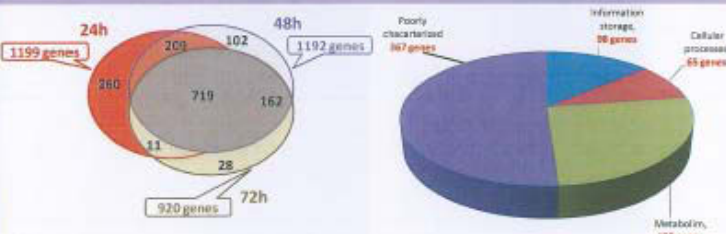
Staphylococcus xylosum is a commensal of the skin and the mucous membranes of animals. Consequently, it is naturally present in food of animal origin and frequently isolated from meat. It is one of the major starter cultures used for sausage fermentation. The starter inoculum prepared from a culture grown in laboratory medium is added to the meat batter. The mechanisms by which the inoculum adapts its physiology to meat are not yet understood. A microarray representing the *S. xylosum* C2a genome was used to determine how the gene expression profile was modified during growth and survival in meat by comparison to the inoculum.

Methods

S. xylosum C2a was cultured in a minimum medium to prepare the inoculum. This inoculum was added at 10^7 CFU/g of meat model containing per kg: 5 g of glucose and 27.7 g of NaCl. Total RNAs of *S. xylosum* were extracted from the inoculum and directly in meat after 24, 48 or 72 h of incubation.



Transcriptome of *S. xylosum* in meat



A total of 1491 genes was differentially expressed in meat at 24, 48 or 72 hours of incubation by comparison with the inoculum. It corresponds to a modification of 55% of the genome. More than 50% of these genes were differentially expressed at the three times of incubation. We focused specifically on these 719 genes.

The genes differentially expressed in meat have been classified into different functional categories; the most represented being the information storage and processing, the cellular processes and the metabolism. The expression of many genes involved in energy production and conversion, carbohydrate and amino acid transport and metabolism was up expressed.

COG distribution of differentially up- and down-regulated genes in transcriptome. [J] translation, ribosome structure, and biogenesis; [K] transcription; [L] replication, recombination, and repair; [M] cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning; [N] cell wall/membrane/envelope biogenesis; [O] signal transduction mechanisms; [P] posttranslational modification, protein turnover, and chaperones; [Q] intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; [R] energy production and conversion; [S] amino acid transport and metabolism; [T] nucleotide transport and metabolism; [U] carbohydrate transport and metabolism; [V] inorganic ion transport and metabolism; [W] secondary metabolite biosynthesis, transport, and catabolism; [X] general function prediction only; [Y] function unknown.

24^{ème} congrès FoodMicro
septembre 2014 Nantes, France

STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN A GENE EXPRESSION IN SLICED HAM UNDER MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING

Velebit Branko¹, Leroy Sabine², Talon Regine², Jankovic Vesna², Vermassen Aurèle²



¹Institute of Meat Hygiene and Technology, Kacanakov 10, 11040 Belgrade, Serbia

²INRA, UR454 Microbiologie, Centre de Clermont-Ferrand Theix, F-63122 Saint-Genès Champanelle, France

INTRODUCTION

The bacteriophage-encoded staphylococcal enterotoxin A (SEA) is the toxin which has been the most frequently reported to be involved in staphylococcal food poisoning while uncooked meat products such as hams are known to be the major source of intoxication.

Nowadays, these meat products are retail packaged into modified atmosphere of gases (nitrogen and carbon dioxide) to reduce growth of *S. aureus* and other food pathogens.

However, industrial packaging flaws (insufficient vacuum phase during packing, false valve-regulated gases ratio, retention pockets between tray and food), enable limited oxygen influx into packaging thus generating conditions for altered *S. aureus* growth.

OBJECTIVE

The objective of the study was to investigate sea expression and SEA synthesis in artificially contaminated sliced smoked ham packaged under modified atmosphere packaging.

MATERIALS AND METHODS

Sliced smoked pork ham previously sterilized by cobalt-60 gamma radiation (25kGy) had been used as testing matrix. Reference strain *S. aureus* NCTC 10652 had been used for inoculation of matrix.

Inoculated ham slices were packaged in two group of MAP: the first one contained no oxygen (70% N₂ and 30% CO₂). The second one contained 92% of N₂ and 8% of O₂. Samples were kept for 7 days at 13°C thus simulating temperature abuse.

Total RNA was extracted using Trizol/Chloroform method and subsequently purified with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). Reverse transcription of housekeeping gene and sea gene was performed using Superscript III One Step RT-PCR (Invitrogen, USA). Detection of cDNA was achieved using Brilliant II Ultra Fast SYBR Green Master Mix (Agilent, USA). PCR primers are shown below. These amplified a region of *ftsZ* housekeeping gene encoding essential cell division protein that forms a contractile ring structure (Z ring) at the future cell division site and sea gene:

ftsZ-F: ATCCAAATCGGTGAAAAATTAACAC
ftsZ-R: CCATGTCTGCACCTTGGATTG

sea-F: TCAATTATGGCTAGACGGTAAACAA
sea-R: GAAGATCCAACCTCTGAACAGTTACA

Gene expression was evaluated using 2-delta-delta Ct method.

SEA detection was performed by using PEG 20000 concentration followed by immunoenzymatic VIDAS SET2 kit (BioMérieux, France).

RESULTS

Expression of sea gene of *S. aureus* grown in contaminated samples packaged in low-oxygen atmosphere over the period of 7 days in 12 hrs intervals is shown in Figure 1.



Figure 1. Dynamics of sea gene expression during 7 days

Relative fluorescence values of SEA detected in contaminated samples packaged in low-oxygen atmosphere over the period of 7 days in 12 hrs intervals are shown in Figure 2.

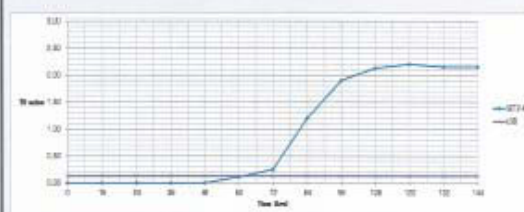


Figure 2. Dynamics of SEA synthesis during 7 days

CONCLUSIONS

- During 7-days exposure in no-oxygen atmosphere, there was no significant expression of sea nor detectable amount SEA;
- In low oxygen atmosphere, sea gene was up-regulated from 36 hrs until 5th day and suddenly down-regulated until the end of the study;
- SEA synthesis in low oxygen atmosphere began in period 48-72 hrs and exponentially increased until 96-108 hrs of incubation.
- Our findings strongly suggest that commercial MAP packaging of uncooked meat products suffering flaws in oxygen barrier characteristics do present a risk to consumers, especially if combined with temperature abuse.

ACKNOWLEDGEMENTS



This study was funded by the joint Serbian-French PHC Pavle Savić bilateral project (No. 27596WB and 680-00-132/2012-09/16) "Understanding gene expression of *Staphylococcus aureus* in sliced meat products to reduce risk of food poisoning".

23^{ème} congrès FoodMicro
septembre 2012 Istanbul, Turkey

INRA

Aurore Vermassen, Pierre Mischeau, Jean-Paul Chacornac, Régine Talon, Sabine Leroy

INRA UR 454 Microbiologie
Centre de Clermont Ferrand - Theix
63122 Saint-Genès Champanelle
FRANCE

aurore.vermassen@clermont.inra.fr
regine.talon@clermont.inra.fr
sabine.leroy@clermont.inra.fr

Transcriptomic response of *Staphylococcus xylosus* to nitrate-nitrite in meat model



Introduction

Staphylococcus xylosus is a commensal of skin and mucous membranes of animals. This ubiquitous bacterium is naturally present in food of animal origin. *S. xylosus* is currently used as a starter culture for meat fermentation. The ability of bacteria to respond to physico-chemical stress is related to their ability to survive in food product. In meat cured products, nitrate and nitrite are authorized as additives but it is recommended to restrict their intake in food. The impact of these additives on the physiology of meat starter cultures is still few explored. Our aim was to characterize the global gene expression profile of *S. xylosus* induced by nitrate and nitrite in a meat model.

Methods

The meat model used was minced pork with a low initial contamination. *S. xylosus* was inoculated at 10^8 CFU/g of meat containing glucose (0.5%), NaCl (2.8%) and in presence or not of nitrate (0.018%) and nitrite (0.005%). The meat batter was incubated at 22°C up to 72 hours. To investigate the global gene expression, we have developed a *S. xylosus* specific microarray.

Conclusion

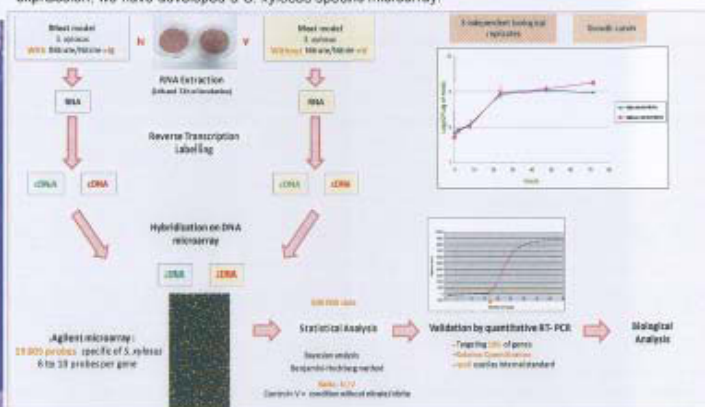
These results are the first data on the physiology of *S. xylosus* *in situ* in a meat model in presence of nitrogen compounds. They indicated a global change in genes expression of *S. xylosus* with many of them implicated in metabolism. Several genes dedicated to transport and binding of iron were over expressed after 24 and 72 hours of incubation in presence of nitrate and nitrite. The genes implicated in the branched chain amino acids transport and metabolism were under expressed.

The presence of nitrate and nitrite induced an oxidative stress revealed by over expression of genes such as those encoding catalases and alkyl hydroperoxidases.

This study allowed a better understanding of the physiology of *S. xylosus* *in carn* in presence of nitrogen compounds.

Figure 2: Genes of *S. xylosus* C2s involved in metabolism differentially expressed in presence of nitrate/nitrite after 24 hours (■) or 72 hours (■) of incubation in meat model.

Acknowledgements: The authors are grateful to Anne de La Faye of INRA, Plateforme d'Exploration du Métabolisme Centre de Clermont Ferrand - Theix France for the statistical analysis of the transcriptomic data.



Impact of nitrogen compounds on the transcriptome

More than 600 genes of *S. xylosus* were differentially expressed at 24 or 72 hours of incubation in meat model in presence of nitrate and nitrite. The genes have been classified into different functional categories, the most represented being the information storage and processing, the cellular processes (including response to oxidative stress) and the metabolism (figure 1).

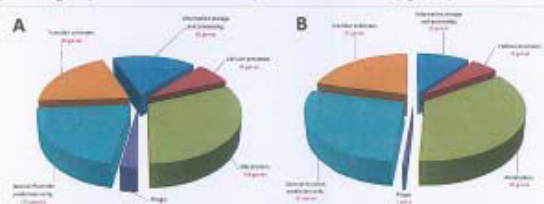
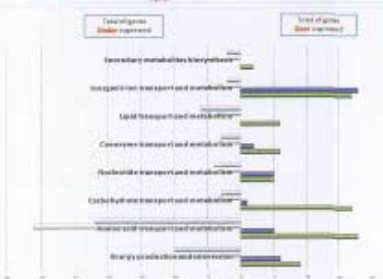


Figure 1: Functional categories of genes of *S. xylosus* C2s differentially expressed in presence of nitrate/nitrite after 24 hours (A) or 72 hours (B) of incubation in meat model.



The expression of the genes implicated in metabolism was highly modulated in presence of nitrate and nitrite (figure 2). Among them, some were related to iron acquisition (inorganic ions transport) and to amino acid metabolism. Genes involved in nitrate and nitrite reduction were weakly or not differentially expressed. The results of microarray hybridizations were validated by quantitative RT-PCR by targeting 10% of genes differentially expressed.

8^{ème} congrès Biometals
juillet 2012 Brussels, Belgique

 **INRA**
Aurore Vermassen, Sabine Leroy
Régine Talon
INRA, UR 454 Microbiologie
Centre de Clermont Ferrand - Thies
F-63122 Saint-Genès Champanelle
FRANCE
aurore.vermassen@clermont.inra.fr
sabine.leroy@clermont.inra.fr
regine.talon@clermont.inra.fr

Conclusion

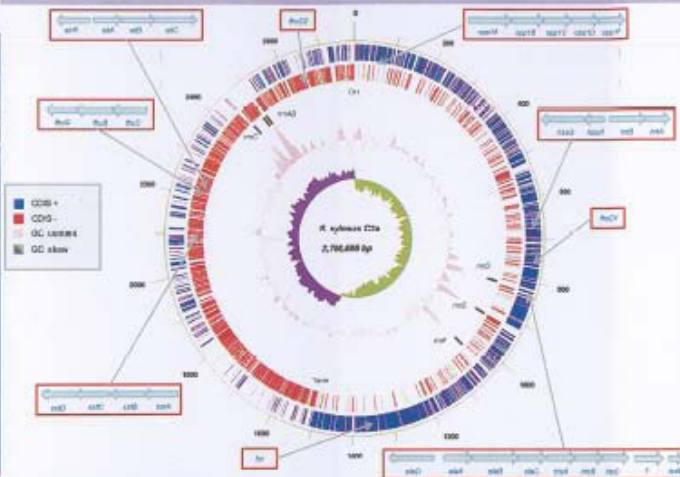
The genome sequence of *S. xyloso* C2a has revealed many genes dedicated to transport and binding of iron. We have characterised for the first time, the behaviour of *S. xyloso*, a meat starter culture, in presence of different iron sources. Depending on the iron sources, the growth was more or less promoted. Iron deprivation modified strongly the growth of *S. xyloso*. One of its preferential source of iron is ferritin which is abundant in meat. Despite the abundance of heme as an iron source in meat, *S. xyloso* seems surprisingly unable to use these iron forms. The *S. xyloso* strain C2a can produce siderophore which could be correlated with the presence of a complete *hts-sfa* locus. The study of expression of genes involved in iron acquisition during growth of *S. xyloso* *in vitro* and *in carni* is still in progress.

Acknowledgements The authors are grateful to Anne-Maria Delort and Virginie Vossier of the Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (UMR6206, SEESIB-France) for their advices for the CAS method.

Iron acquisition in *Staphylococcus xylosus*, a meat starter culture



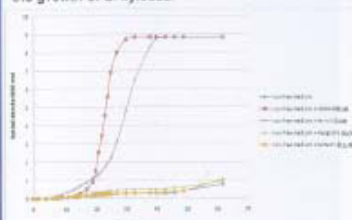
Staphylococcus xylosox is an ubiquitous Gram-positive bacterium belonging to the vast group of coagulase-negative staphylococci. This species is found on the skin of mammals and frequently isolated from food plants and fermented products of animal origin. *S. xylosox* is a food grade *Staphylococcus* species and is commonly used as a starter culture for meat fermentation. We sequenced the whole genome of *S. xylosox* strain C2a, which harbours a circular chromosome of 2,786,686 bp with 2,641 ORFs. Genome analysis revealed several iron-related genes.



The whole-genome sequencing has revealed that *S. xylosum* has different iron-related genes encoding proteins that could be involved in either transport or binding. The *fts-sfs* locus encodes enzymes synthesizing staphyloferrin A and the required ABC-transporter. Moreover, other iron acquisition systems such as ferrichrome ABC transporter (the *huoCBG*) and the Fe²⁺ lipoprotein receptor (*rhuD*), the SatABC ABC iron-regulated transporter, the iron-manganese ABC transporter (*satABC*) and the oligopeptide permease (*opp1ABCD*) have been identified. Several regulators like the ferric uptake regulator (*fur*), the heme regulated system (*hrt*) and the heme sensor system (*hss*) are also present.

Growth of *S. xylosum* C2a with different iron sources

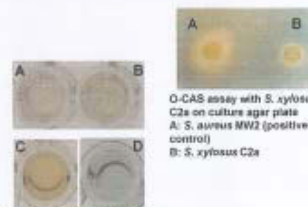
The *S. xylosum* strain C2a was grown in iron-free chemically defined medium supplemented with FeSO_4 (80 μM), ferritin (2 μM), myoglobin (8 μM) or hematin (0.2 μM) as iron sources. *S. xylosum* can survive on an iron-free medium. The growth of *S. xylosum* was enhanced in the presence of FeSO_4 and ferritin. On the opposite, the presence of hemic compounds did not promote its growth. Moreover the increase of hematin concentration strongly inhibited the growth of *S. xylosum*.



Growth curves at 33°C in iron-free medium of *Staphylococcus xylosum* C2a supplemented or not with different iron sources

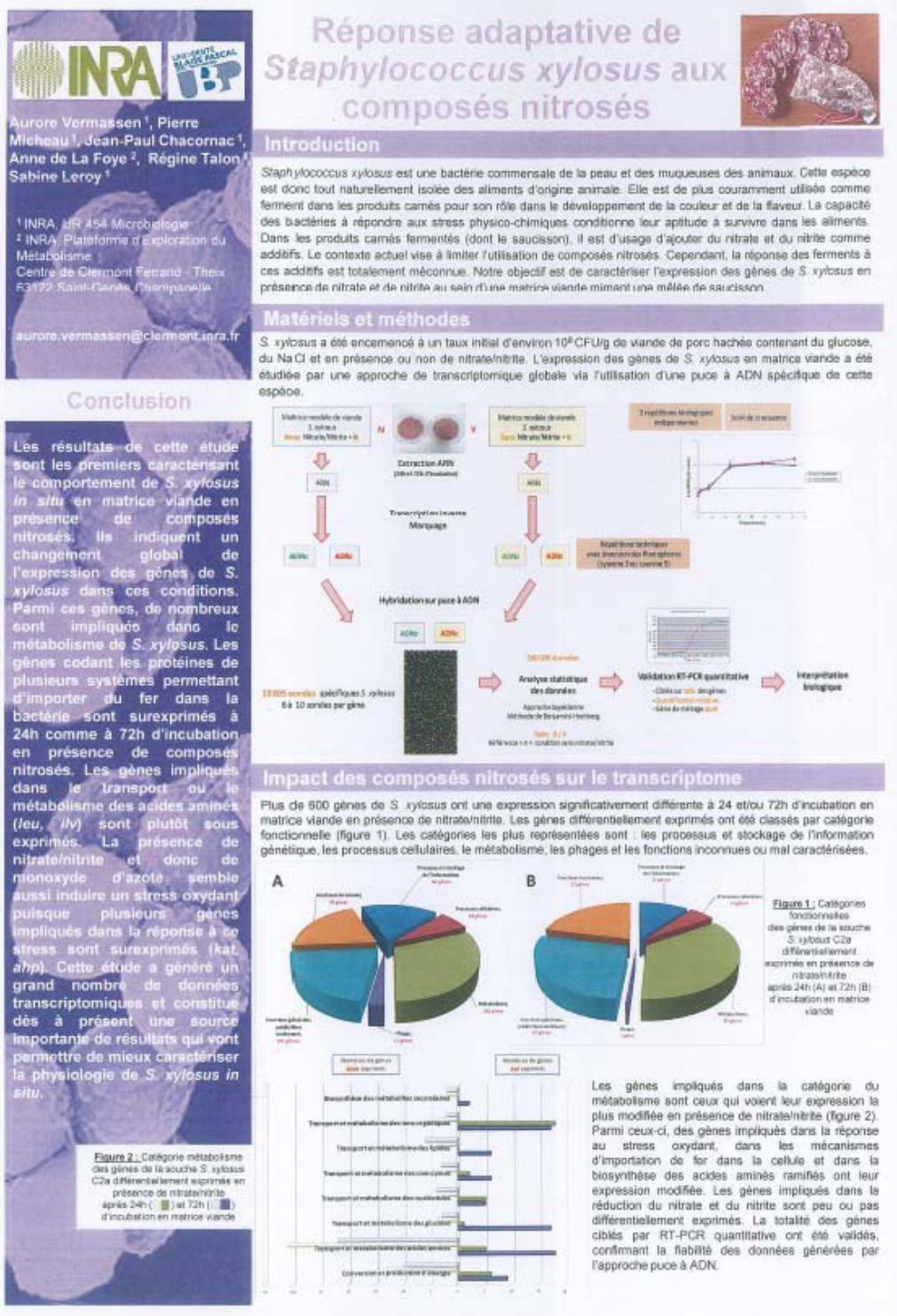
Chrome Azurol S (CAS) assay

The *S. xyloso* strain C2a was incubated in iron-free chemically defined medium of *Staphylococcal* Siderophore Detection medium (SSD). Culture supernatants or culture agar plates were assayed for siderophore production. We have shown that the C2a strain produced siderophore in both conditions.



CAS assay with *S. xyloso* C2a
A: Iron-free medium supernatant
B: SSD medium supernatant
C: Pyoverdine = positive control
D: CAS medium = negative control

Journées de l'Ecole doctorale des Sciences de la vie
mai 2012 Clermont-Ferrand, France



ANNEXES

ANNEXE 1

Plateforme NCBI GEO GPL19201

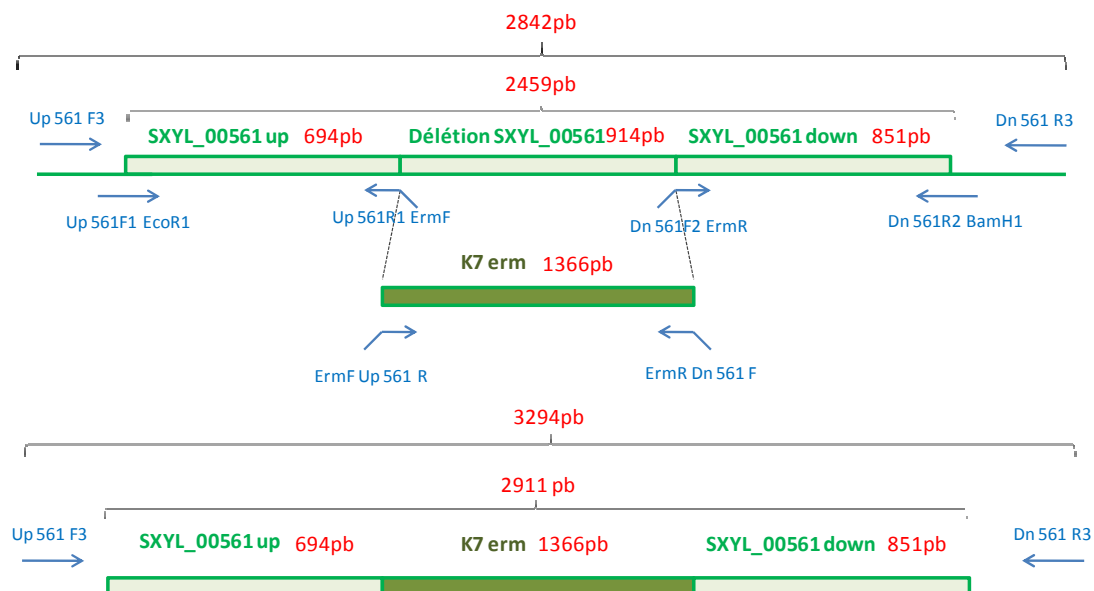
Platform GPL19201		Query DataSets for GPL19201						
Status	Public on Sep 18, 2014							
Title	Agilent-020575 Staphylococcus xylosus array							
Technology type	in situ oligonucleotide							
Distribution	custom-commercial							
Organism	Staphylococcus xylosus							
Manufacturer	Agilent Technologies							
Manufacture protocol	see manufacturer's web site at http://www.agilent.com/							
Description	<p>Staphylococcus xylosus C2a complete genome micro array.</p> <p>Arrays of this design have barcodes that begin with 16020575 or 2520575.</p> <p>Orientation:</p> <p>Features are numbered numbered Left-to-Right, Top-to-Bottom as scanned by an Agilent scanner (barcode on the left, DNA on the back surface, scanned through the glass), matching the FeatureNum output from Agilent's Feature Extraction software.</p> <p>The ID column represents the Agilent Feature Extraction feature number.</p> <p>Rows and columns are numbered as scanned by an Axon Scanner (barcode on the bottom, DNA on the front surface).</p> <p>To match data scanned on an Axon scanner, use the RefNumber column contained in the Agilent-provided GAL file as the ID_REF column in sample submissions.</p>							
Submission date	Sep 17, 2014							
Last update date	Sep 18, 2014							
Contact name	Sabine Leroy							
E-mail	sabine.leroy@clermont.inra.fr							
Phone	+33473624595							
Organization name	INRA							
Department	MICA							
Lab	UR454 Microbiology							
Street address	Clermont-Ferrand Theix Research Center							
City	Saint-Genès Champanelle							
ZIP/Postal code	F63122							
Country	France							
Samples (12)	GSM1507250 , GSM1507251 , GSM1507252 , GSM1507253 , GSM1507254 , GSM1507255							
More...								
Series (1)	GSE61514 Transcriptomic analysis of Staphylococcus xylosus in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response							
Data table header descriptions								
ID	Agilent feature number							
COL	Column							
ROW	Row							
NAME	NAME							
SPOT_ID	Spot identifier							
CONTROL_TYPE	Control type							
GB_ACC	GenBank Accession number							
GI								
SPOT_ID								
ACCESSION_STRING	Accession String							
CHROMOSOMAL_LOCATION	Chromosomal Location							
ORF								
SEQUENCE	Sequence							
Data table								
ID	COL	ROW	NAME	SPOT_ID	CONTROL_TYPE	GB_ACC	GI	SPOT_ID
1	266	170	GE_BrightCorner	GE_BrightCorner	pos			
2	266	168	DarkCorner	DarkCorner	pos			
3	266	166	DarkCorner	DarkCorner	pos			
4	266	164	DarkCorner	DarkCorner	pos			
5	266	162	DarkCorner	DarkCorner	pos			
6	266	160	DarkCorner	DarkCorner	pos			
7	266	158	DarkCorner	DarkCorner	pos			
8	266	156	DarkCorner	DarkCorner	pos			
9	266	154	DarkCorner	DarkCorner	pos			
10	266	152	DarkCorner	DarkCorner	pos			
11	266	150	DarkCorner	DarkCorner	pos			
12	266	148	SX#2#C2a#1944_10	SX#2#C2a#1944_10	FALSE	LN554884.1	683402866	
13	266	146	SXIaComp5714 5724 6	SXIaComp5714 5724 6	FALSE	LN554884.1		interaenic re

ANNEXE 2

Séries NCBI GEO GSE61514

Series GSE61514		Query DataSets for GSE61514
Status	Public on Oct 08, 2014	
Title	Transcriptomic analysis of <i>Staphylococcus xylosus</i> in the presence of nitrate and nitrite in meat reveals its response to nitrosative stress	
Organism	Staphylococcus xylosus	
Experiment type	Expression profiling by array	
Summary	<p><i>Staphylococcus xylosus</i> is one of the major starter cultures used for meat fermentation because of its crucial role in the reduction of nitrate to nitrite, which contributes to color and flavor development. Despite the long use of these additives, their impact on the physiology of <i>S. xylosus</i> has not yet been explored. We present the first in situ global gene expression profile of <i>S. xylosus</i> in meat supplemented with nitrate and nitrite. More than 600 genes of <i>S. xylosus</i> were differentially expressed at 24 or 72 hours of incubation. They represent more than 20% of the total genes and led us to suppose that addition of nitrate and nitrite to meat leads to a global change in gene expression. This profile revealed that <i>S. xylosus</i> is subject to nitrosative stress caused by reactive nitrogen species generated from nitrate and nitrite. To overcome this stress, <i>S. xylosus</i> has developed several oxidative stress resistance mechanisms, such as modulation of the expression of several genes involved in iron homeostasis and in antioxidant defense. Most of these genes belong to the Fur and PerR regulons respectively. <i>S. xylosus</i> has also counteracted this stress by developing DNA and protein repair. Furthermore, it has adapted its metabolic response—carbon and nitrogen metabolism, energy production and cell wall biogenesis—to the alterations produced by nitrosative stress.</p>	
Overall design	<p>Microarray was used to evaluate modification in the transcriptome of <i>S. xylosus</i> C2a strain in the presence (N) or absence (V) of nitroso compounds. Three biological replicates collected on separate days for each meat matrix and labelled following a dye-switch design; for each condition one labeling in Cy3 and one in Cy5.</p>	
Contributor(s)	Vermassen A , de La Foye A , Loux V , Talon R , Leroy S	
Citation missing	Has this study been published? Please login to update or notify GEO .	
Submission date	Sep 17, 2014	
Last update date	Oct 08, 2014	
Contact name	Sabine Leroy	
E-mail	sabine.leroy@clermont.inra.fr	
Phone	+33473624595	
Organization name	INRA	
Department	MICA	
Lab	UR454 Microbiology	
Street address	Clermont-Ferrand Theix Research Center	
City	Saint-Genès Champanelle	
ZIP/Postal code	F63122	
Country	France	
Platforms (1)	GPL19201 Agilent-020575 <i>Staphylococcus xylosus</i> array	
Samples (12)	GSM1507250 C2aN24cys3_V24cys5R1	
* More...	GSM1507251 C2aV24cys3_N24cys5R1 GSM1507252 C2aN24cys3_V24cys5R2	

ANNEXE 3

Construction du mutant *S. xylosus* C2a Δ SYIL_00561 (gène codant une oxydo-réductase)

RESUME

Staphylococcus xylosus est couramment utilisé comme ferment dans les produits carnés pour son rôle dans le développement de la flaveur et de la couleur. Beaucoup de propriétés technologiques ont été caractérisées *in vitro*. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en place par cette bactérie pour s'adapter à une matrice carnée et aux composés nitrosés, fréquemment ajoutés dans ces produits, étaient méconnus. Pour identifier ces mécanismes, des approches de transcriptomique globale ont été mises en œuvre. *S. xylosus* survit dans un modèle viande en modulant l'expression de 55 % de ses gènes. Il surexprime des gènes codant des protéines impliqués dans le catabolisme du glucose et du gluconate et des gènes codant des peptidases. En parallèle, il sous exprime de nombreux gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés probablement en raison de leur disponibilité dans le modèle viande. Le modèle viande est un milieu riche en divers substrats et la bactérie pourrait adapter sa physiologie via les régulateurs transcriptionnels CcpA et CodY. *S. xylosus* répond au sel ajouté au modèle viande en surexprimant des gènes impliqués dans des mécanismes d'osmoprotection, d'extrusion de Na⁺ et de protons. *S. xylosus* répond aux composés nitrosés dans le modèle viande en modulant 24 % de son génome. Ces composés nitrosés génèrent un stress nitrosant et *S. xylosus* répond à ce stress par la surexpression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer via la dérégulation du régulateur Fur. *S. xylosus* surexprime aussi des gènes codant des enzymes antioxydants via la dérégulation du régulateur PerR. De plus, il surexprime des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et des protéines. La viande est un aliment riche en fer hémique et non hémique. Ainsi, *S. xylosus* est capable d'acquérir du fer à partir de ferritine, de transferrine et potentiellement des hémoprotéines. La ferritine est une source préférentielle de fer pour *S. xylosus*. Un opéron codant potentiellement un complexe membranaire impliqué dans des réactions d'oxydo-réduction a été identifié. Un mutant de délétion/insertion dans le premier gène de l'opéron confirme que ce système pourrait jouer un rôle dans l'acquisition du fer de la ferritine chez *S. xylosus*.

Cette étude révèle un changement global dans l'expression des gènes de *S. xylosus* dans un modèle viande, elle souligne la capacité de *S. xylosus* à s'adapter à un stress osmotique ou nitrosant et elle caractérise pour la première fois la capacité d'un staphylocoque à utiliser du fer de la ferritine.

Mots clés: *S. xylosus*, ferment, viande, transcriptome, puce à ADN, composés nitrosés, ferritine, stress nitrosant, stress osmotique

ABSTRACT

Staphylococcus xylosus is used as starter culture in meat product for its role in the development of flavor and color. *S. xylosus* is characterized for its technological properties *in vitro*. However, the molecular mechanisms for its adaptation in meat with or without nitrate and nitrite, frequently added in meat product, remained unknown. Global transcriptomic approaches were carried out to determine the molecular mechanisms. *S. xylosus* modulated the expression of 55 % of the genes to survive in a meat model. Many genes encoding proteins involved in glucose and gluconate catabolisms and peptidases were up expressed. In parallel, a lot of genes involved in amino acids synthesis were down regulated, probably due to their availability in the meat model. The meat model is a rich medium composed of various substrates and *S. xylosus* adapted its physiology through the transcriptional regulators CcpA and CodY. Finally, it responded to salt added in the meat model in overexpressing genes involved in mechanisms of osmoprotection, Na⁺ and H⁺ extrusion. *S. xylosus* modulated the expression of 24 % of the genes in presence of nitroso compounds in the meat model. These compounds generated a nitrosative stress. *S. xylosus* responded to this stress by over expressing genes involved in iron homeostasis through the derepression of the regulator Fur. It over expressed also genes encoding antioxidant enzymes through the derepression of the regulator PerR. Moreover, it over expressed genes involved in DNA and proteins repairs. Meat is rich in hemic and non-hemic iron. *S. xylosus* is able to grow in presence of ferritin, transferrin and potentially hemoproteins. Ferritin is one of preferential iron sources. An operon encoding potentially a membranous complex involved in oxydo-reduction reactions has been identified. A strain defective in the first gene of the operon confirmed that this complex could contribute to the iron acquisition from ferritin.

This study revealed a global change in the gene expression of *S. xylosus* in the meat model; it highlighted ability of *S. xylosus* to mitigate nitrosative or osmotic stress, it characterised for the first time the capacity of a *Staphylococcus* to acquire ferritin-iron.

Keywords: *S. xylosus*, starter, meat, transcriptome, microarray, nitroso compounds, ferritin, nitrosative stress, osmotic stress